

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Virologie
der Deutschen Forschungsgemeinschaft
1 Berlin 42, Wenckebachstraße 23
Direktor: Professor Dr. K.-O. Habermehl

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
VESICULAR STOMATITIS VIRUS UND INHIBITOREN DER
PROTEINSYNTHESE AUF DEN ABLAUF DER ZELLTEILUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Peter John

aus Bitterfeld

1972

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Virologie
der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

1 Berlin 42, Wenckebachstraße 23

Direktor: Professor Dr. K.-O. Habermehl

Untersuchungen über den Einfluß von Vesicular Stoma-
titis Virus und Inhibitoren der Proteinsynthese auf
den Ablauf der Zellteilung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

J o h n , Hans-Peter

Bitterfeld

Referent: Professor Dr. K.-O. Habermehl

Korreferent: Professor Dr. D. Neubert



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24. März 1972

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung und Fragestellung

II. Material und Methodik

III. Ergebnisse

A) Verhalten der Zellteilung nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus

1. Hinweis auf eine Mitosesteigerung und auf einen Colchizin-ähnlichen Effekt.
2. Nachweis einer Mitosesteigerung und eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Vesicular Stomatitis Virus-infizierten Kulturen durch Behandlung mit Colcemide. Morphologische Veränderungen der Zellen in der Telophase.
3. Beziehungen zwischen Mitoseveränderungen und zeitlichem Ablauf der Virusreproduktion.

B) Verhalten der Zellteilung Vesicular Stomatitis Virus-infizierter Zellen unter der Einwirkung von Inhibitoren der Virusreproduktion.

1. Einfluß von Guanidin auf die Reproduktion von Vesicular Stomatitis Virus.
2. Hemmung der Reproduktion von Vesicular Stomatitis Virus durch p-Fluorophenylalanin.
3. Veränderungen im Mitoseablauf Vesicular Stomatitis Virus-infizierter Zellen nach Einwirkung von p-Fluorophenylalanin.

C) Verhalten nichtinfizierter Zellen unter der Einwirkung von p-Fluorophenylalanin.

1. Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes und einer geringen Mitosesteigerung in den ersten Stunden der Einwirkung von p-Fluorophenylalanin.
2. Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes nach längerer Einwirkung von p-Fluorophenylalanin.

D) Unterschiedliche Einwirkungen von p-Fluorophenylalanin auf die Zellteilung in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors.

E) Verhalten nichtinfizierter Zellen unter der Einwirkung von Puromycin.

1. Die Abhängigkeit der Wirkung von Puromycin von der Dosis.
2. Verhalten der Mitose unter dem Einfluß von Puromycin.
3. Verhalten Puromycin-behandelter Zellen unter dem Einfluß von Colcemide.

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. Einleitung und Fragestellung

Die Virusinfektion einer Zelle führt zu unterschiedlichen Reaktionsformen von Mitoseablauf und Chromosomenstruktur. Abgesehen von den Vorgängen bei der malignen Transformation, gewinnen virusbedingte Änderungen der Zellteilung zunehmend eine praktische Bedeutung.

In der Mehrzahl der Fälle führt die Virusinfektion einer Zelle zur Hemmung der Mitose. So wird beispielsweise eine Infektion mit Vaccinia Virus von einer weitgehenden Hemmung der Zellteilung gefolgt (HABERMEHL et al. (1966)a). Nach Infektion von HeLa-Zellen mit Herpes simplex-Virus kommt es nahezu vollständig zur Hemmung der Zellteilung (STOKER et al. (1959 a,b); WILDY et al. (1961)).

Auch nach Infektion von HeLa-Zellen mit Influenza-Virus oder mit dem Newcastle-disease-Virus fand sich ein kontinuierlicher Abfall der Mitoserate (WHEELOCK et al. (1959)). Weiterhin führen folgende Viren zu einer Einschränkung der Mitose: Adenovirus Typ 5 (GODMAN et al. (1960)), Adenovirus Typ 1-4 (BOYER et al. (1957)), Hundehepatitisvirus (FASTIER (1960)) und Myxoviren (LEPINE et al. (1959)).

Nach Infektion mit Ektromelievirus, Parainfluenzavirus III und ME-Virus ist zunächst eine temporäre Zunahme der Zellteilung zu beobachten. Sie bleibt jedoch unterhalb der Werte der Kontrollkulturen und geht dann zurück (HABERMEHL et al. (1966)a).

Eine Steigerung der Zellteilung um etwa das Doppelte der Norm fand sich nach Infektion mit Poliomyelitis-Virus (HABERMEHL et al. (1966)a). Es zeigte sich, daß dieser Effekt streng virusspezifisch ist. Nur die ersten Stadien der Virusrepro-

duktion - bis zum Stadium der Polymerisation der Virus-RNS - sind hierfür erforderlich (HABERMEHL et al. (1966)b).

Erst wenn durch Behandlung mit Guanidin der Polio-induzierte cytopathische Effekt verhindert wird und somit der Infektionsablauf länger beobachtet werden kann, zeigt sich in den späten Stadien (nach 5-6 Stunden) eine Arretierung der Metaphasen, ein Colchizin-ähnlicher Effekt (HABERMEHL et al. (1969)).

Unabhängig von den virusbedingten Änderungen der Mitose, lassen sich bei zahlreichen Virusinfektionen Chromosomenaberrationen nachweisen. Nach Infektion mit Poliomyelitisvirus konnte gezeigt werden, daß die frühen Stadien des Reproduktionszyklus für die Entstehung von Chromosomenbrüchen verantwortlich sind (BARTSCH et al. (1967), (1969)).

Es zeigte sich wiederholt, daß für eine Reihe von Mitosestörungen die frühen Stadien der Virusreproduktion verantwortlich sind (HABERMEHL et al. (1969)). Die Zusammenhänge sind noch unklar. Ein bedeutsamer Faktor dürfte darin zu suchen sein, daß eine Anzahl von Viren im Infektionsbeginn eine Hemmung der Synthese zellulärer Nukleinsäuren und Proteine bewirken. Ausführliche Untersuchungen über diesen Abschaltmechanismus liegen für das Poliomyelitisvirus vor (DIEFENTHAL et al. (1965), (1967), (1971 a)). Beim VSV wird lediglich die RNS und nicht die Proteinsynthese der Zelle abgeschaltet (DIEFENTHAL et al. (1971 b)).

Da beim VSV nicht nur bezüglich der Regulation des Wirtsstoffwechsels Besonderheiten bestehen, sondern darüber hinaus auch bezüglich des Mitoseverhaltens nur erste informatorische Ergebnisse vorlagen (HABERMEHL et al. (1966 a)), sollte dieses Virussystem im folgenden näher untersucht werden.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß VSV nur eine geringgradige Mitosestimulierung verursacht. Darüber hinaus wird

der Ablauf der Metaphasen gehemmt. Bei der gleichzeitigen Einbeziehung von Inhibitoren der Proteinsynthese ergaben sich zusätzlich Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Proteinsynthese und Ablauf der Zellteilung.

II. Material und Methodik

Virus

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit dem Indiana-Stamm des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) durchgeführt. Zur Herstellung des zur Inokulation verwendeten Virus wurden gut ausgewachsene, zwei Tage alte, in Rouxflaschen angezüchtete HEp-2-Zellen verwendet. Nach Absaugen des zur Anzüchtung notwendigen Mediums wurde das Stammvirus der vorhergehenden Passage im Verhältnis 1:5 mit dem Nährmedium verdünnt und je 20 ml als Inokulum in die Rouxflaschen gegeben. Nach einer Adsorptionszeit von 45 Minuten - zur besseren Verteilung des Virus wurden die Flaschen mehrfach bewegt - wurde das Inokulum entfernt. Die Zellen wurden einmal mit Nährmedium gewaschen und je Rouxflasche wurden 60 ml Nährmedium mit Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum aufgegeben. 24 Stunden nach der Virusinokulation zeigten die Zellen einen ausgeprägten cytopathischen Effekt und hatten sich zum großen Teil von der Glaswand abgelöst. Die noch an der Glaswand haftenden Zellen waren rund und granuliert, die Kerne pyknotisch. Diese Zellen wurden durch Schütteln mit Glasperlen abgelöst und das überstehende Medium zusammen mit dem Zelldetritus bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang heftig von Hand mit Glasperlen geschüttelt. Damit wurden weitere Zellen zerstört und das darin befindliche Virus freigesetzt. Anschließend wurde 10 Minuten lang bei 3000 Upm zentrifugiert, um die groben Zellreste zu entfernen. Die überstehende Flüssigkeit wurde zur Inokulation verwendet und bei -70°C aufbewahrt.

Die Herstellung des Virusinokulums des in einem Versuch verwendeten Poliomyelitisvirus vom Typ I, Stamm Mahoney, erfolgte in gleicher Weise.

Gewebekulturen

Für die durchgeführten Experimente wurden der permanente Zellstamm HEP-2 (NORRYD et al. (1963)) und primär angezüchtete Hühnerfibroblasten verwendet.

Der permanente Zellstamm wurde in Rouxflaschen gezüchtet und jeden zweiten Tag passagiert. Die Zellpassage erfolgte jeweils von vollständig ausgewachsenen Zellkulturen. Bei der Passage wurden die Zellen, nach Absaugen des Nährmediums, von der Flaschenwand mittels einer 0,2 %-igen Trypsinlösung mit Zusatz von 2,5 % 0,1 M. Versen, abgelöst. Von dieser Trypsin-Versen-Lösung wurden jeder Flasche 20 ml bei 37° C aufgegeben. Nach etwa 6 Minuten konnten die Zellen durch leichtes Schwenken der Flaschen von der Glaswand abgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen in eisgekühlte Zentrifugengläser überpipettiert, um eine weitere Trypsin-einwirkung zu unterbrechen. Durch Zentrifugieren bei 500 Upm für 3 Minuten wurden die Zellen abgetrennt und die überstehende Trypsin-Versen-Lösung abpipettiert. Das Zellsediment wurde in frischer, vorgewärmter Nährlösung resuspendiert. Dabei wurde das Volumen so bemessen, daß aus einer Rouxflasche drei neue angesetzt werden konnten.

Für die Experimente und die Titerbestimmung wurde die Zellsuspension in Plastik-Petrischalen von 6 cm Durchmesser der Firma Falcon Plastics, California, USA, einpipettiert. Für Versuche, bei denen Mitosezählungen durchgeführt werden sollten, war ein Deckglas von 24 x 18 mm in die Petrischalen eingelegt worden. Die Zellen konnten so gleichmäßig auf dem Boden der Petrischalen und auf dem Deckglas auswachsen. Das Deckglas wurde zu den in den einzelnen Versuchen angegebenen Zeiten entnommen und weiter histologisch bearbeitet. Nach dem Einpipettieren der Zellsuspension in die Petrischalen wurden

diese in eine Begasungsanlage unter 5 % CO_2 bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer Temperatur von 37°C inkubiert (DIEFENTHAL et al. (1962)). 48 Stunden nach der Passage waren die Zellen zu einem dichten einschichtigen Rasen ausgewachsen (Monolayer)!

Zur Gewinnung von Hühnerfibroblasten wurden 10 Tage bebrütete Hühnereier verwendet. Die Embryonen wurden herausgenommen und anschließend Gehirn, Eingeweide und Augen entfernt. Mit einer Schere wurden die Embryonen feingeschnitten und in 0,2 %-iger Trypsinlösung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) nach DULBECO (DULBECO et al. (1954)) 10 Minuten lang bei 37°C auf einem Magnetrührer inkubiert. Sodann wurde die überstehende Trypsinlösung verworfen. Hierdurch wurden noch anhaftende Blutreste und zerstörte Zellen entfernt. Anschließend wurde frische Trypsinlösung aufgegeben und durch weitere Inkubation für 25 Minuten auf einem Magnetrührer bei 37°C sowie kräftiges Pipettieren wurden die Gewebestücke in kleinere Zellkomplexe und Einzelzellen aufgeschlossen. Noch verbliebene größere Gewebestücke wurden nochmals kräftig hin und her pipettiert. Zur Abtrennung jetzt noch vorhandener größerer Zellkomplexe wurde durch eine zweifache Mullage filtriert. Zur Unterbrechung der Trypsinwirkung wurde das Filtrat in Eiswasser gekühlt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren 5 Minuten bei 500 Upm abgetrennt und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in Nährmedium resuspendiert. Die Menge des Nährmediums wurde so gewählt, daß eine 1 %-ige Zellsuspension entstand.

Zytologische Technik

Die für die zytologische Beurteilung vorgesehenen Zellen wurden in Falcon-Petrischalen mit eingelegtem Deckglas angezüchtet. Zu den, für die einzelnen Versuche angegebenen jeweiligen Zeitpunkte, wurde das Deckglas mit Nadel und

Pinzette sorgfältig herausgenommen. Um noch anhaftendes Serum und Nährmedium zu entfernen, wurden die Deckgläser 10 mal in phosphatgepufferter Salzlösung eingetaucht. Zur Durchführung der Feulgenfärbung wurden die Zellen anschließend in Formol-Alkohol (1:5) 10 Minuten fixiert und darauf in die absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest. gegeben. Nach kurzem Eintauchen in 1 n-HCl wurden die Deckgläser für 10 Minuten in 60° C warmer 1 n-HCl hydrolysiert. Anschließend wurden die Präparate bei Zimmertemperatur in Schiff'sches Reagenz gebracht. Nach 3-maliger Spülung in SO₂-Wasser und Spülung für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe gegeben, 2 mal in Xylol gebracht und mit Caedax eingedeckt. Für die zytologische Beurteilung und die Feststellung des Mitoseindex wurden je Präparat 3000 Zellen gezählt.

Schiff'sches Reagenz wurde hergestellt, indem 2,0 g Pararosanilin und 40 ml 1 n HCl mit 200 ml kochendem Aqua dest. übergossen und nach Abkühlung auf 60° C durch ein Whatmann Nr. 2-Papier filtriert wurden. Zu dem Filtrat wurden 4,0 g Natrium- (oder Kalium)pyrosulfat und 20 ml 1 n HCl gegeben. Anschließend wurde das Gefäß fest verschlossen, 1 Minute kräftig geschüttelt und für etwa 20 Stunden im Dunkeln bei 18° C stehen gelassen. Zum Klären des Schiff'schen Reagenz wurden ca. 300 mg ausgeglühte Tierkohle hinzugegeben und anschließend - nach kräftigem Schütteln - durch Whatmann Nr. 2-Papier filtriert. Das Filtrat mußte zum Gebrauch wasserklar sein, oder höchstens eine leicht gelbliche Färbung haben. Die Aufbewahrung erfolgte bei + 4° C.

Das SO₂-Wasser wurde aus 30 g in 30 ml Leitungswasser gelöstem Natriumpyrosulfit, dem 30 ml 1 n HCl hinzugegeben wurden und ad 600 ml mit Leitungswasser aufgefüllt wurde, hergestellt.

Plaquetitration

Gut ausgewachsene Zellen in Plastik-Petrischalen wurden mit je 0,3 ml des in Zehnerpotenzen verdünnten Virus inokuliert. Dabei wurden jeweils zwei Petrischalen je Verdünnungsstufe verwendet. Die Virusadsorptionszeit betrug 1 Stunde bei 37° C in 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Hierauf wurde die Inokulationsflüssigkeit abgesaugt. Auf die infizierten Zellen wurde dann ein EAGLE-Medium gegeben, dem Agar (Difco agar purified) in 0,7 %-iger Endkonzentration - bei einer Temperatur von 41° C - zugesetzt worden war.

Die Zellkulturen wurden anschließend zwei Tage bei 37° C in 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit belassen. Hierauf wurden die Zellen mit einer 1:5000 in PBS verdünnten Neutralrotlösung angefärbt. Drei Stunden danach hatten die lebenden Zellen Farbstoff aufgenommen. Die infolge der Viruseinwirkung abgestorbenen Zellbereiche dagegen waren ungefärbt geblieben und somit als Plaque erkennbar.

Nährmedien, Lösungen, chemische Substanzen

Zur Anzucht der Zellkulturen wurde EAGLES minimal essential medium mit Glutamin der Firma General Biochemicals verwendet, dem 10 % inaktiviertes Kälberserum zugesetzt wurde (EAGLE (1955)).

Bei den Versuchen wurde EAGLE/s minimal essential medium mit Glutamin, mit oder ohne Phenylalanin verwendet. Die Sterilisation erfolgte mittels Filtration im Millipore-Filter (Porendichte: 0,22 µ).

PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECO (DULBECO et al. (1954)).

Trypsin von der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio;

PBS und Trypsin wurden im Seitz-Filter EKS mit 1 Atü steril filtriert.

Versen (Äthylendiamintetraessigsäure) = Titriplex III der Firma Merk wurden durch die Glasfrite (G 5) (Firma Schott & Gen.) filtriert.

Puromycin dihydrochloride der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

DL-p-Fluorophenylalanine von der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

Colcemide von der Firma Ciba. - Wir danken der Firma CIBA AG für die freundliche Überlassung der Substanz.

Guanidin hydrochlorid der Firma Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

III. Ergebnisse

A) Verhalten der Zellteilung nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus

1. Hinweis auf eine Mitosesteigerung und auf einen Colchizin-ähnlichen Effekt

In der ersten Versuchsreihe wurden Zellkulturen mit Vesicular Stomatitis Virus infiziert und das Verhalten der Zellteilung vom Infektionsbeginn bis zum Einsetzen des cytopathischen Effektes untersucht.

Es wurden HEP-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. Zum Zeitpunkt 0 wurde ein Teil der Schalen nach Absaugen des Kulturmediums mit je 2,0 ml des Inokulationsmedium überschichtet ($1,7 \times 10^7$ PFU/ml VSV in EAGLE MEMØKS) und für 30 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl von Schalen ebenfalls abgesaugt, mit dem gleichen Volumen EAGLE Medium ohne Virus überschichtet und ebenso inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum von sämtlichen Schalen (Virus und Kontrollen) abgesaugt und durch je 4,0 ml des zum Zeitpunkt 0 abgesaugten Kulturmediums (konditioniertes Medium) ersetzt. Die weitere Behandlung erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen. Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurde aus jeder Schale ein Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 1 ersichtlich. Während in den nichtinfizierten Kontrollzellen der Metaphaseindex sich in der Größenordnung von 45 0/00 hält, was einer annähernd konstanten Zellteilung während des Beobachtungszeitraumes entspricht, ist in den infizierten Zellen von der 3. Stunde nach Infektionsbeginn an eine deutliche Zunahme des Metaphaseindex zu verzeichnen. Die Metaphasen sind 6 Stunden nach Infektionsbeginn um etwa das Doppelte des Ausgangswertes erhöht. In dem folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob die Zunahme des Metaphaseindex nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus auf einer Mitosesteigerung oder auf einem Colchizin-ähnlichen Effekt beruht.

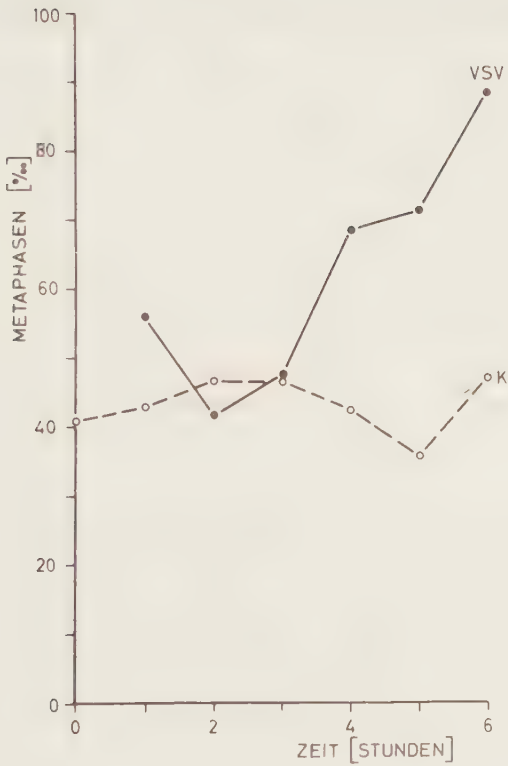


Abb. 1: Zunahme der Metaphasen in HEp-2 Zellen nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus

● — : infizierte HEp-2 Zellen
○ — : nicht infizierte Kontrollzellen

2) Nachweis einer Mitosesteigerung und eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Vesicular Stomatitis Virus infizierten Kulturen durch Behandlung mit Colcemide.
Morphologische Veränderungen der Zellen in der Telophase

Bei den vorliegenden Versuchen wurde die Möglichkeit der Arretierung der Metaphasen verwendet, da durch die eindeutige Erfassung der Metaphaseplatte der Registrierfehler erheblich reduziert wird, zumal eine Zunahme der Metaphaserate auch durch eine Verlängerung dieses Stadiums oder durch eine Arretierung der Mitose in der Metaphase vorgetäuscht werden kann. Aus diesem Grunde wurden sämtliche Reihen mit Zusatz von Colcemide kontrolliert. Hierbei werden alle neu in die Metaphase eintretenden Zellen in diesem Stadium blockiert, so daß jederzeit zwischen einer echten Mitosezunahme und einem Colchizin-ähnlichen Effekt unterschieden werden kann.

Es wurden HEP-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet wurden. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurden ein Teil der Schalen abgesaugt. Gleichzeitig wurde ein Präparat der Kontrollreihe entnommen und histologisch behandelt. Das abgesaugte Kulturmedium wurde durch 2 ml des entsprechenden Inokulationsmediums ersetzt. Die Versuchsanordnung bestand aus einer Kontrollreihe, einer weiteren Kontrollreihe mit Zusatz von Colcemide, einer mit VSV infizierten Reihe ($2,1 \times 10^7$ PFU/ml VSV EAGLE MEM ϕ KS), einer VSV infizierten mit Zusatz von Colcemide behandelten Reihe. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten lang bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurde das Inokulum von sämtlichen Schalen abgesaugt und durch je 5,0 ml des zum Zeitpunkt 0 abgesaugten Kulturmediums (konditioniertes Medium), das für die entsprechenden Versuchsreihen mit Colcemide (Endkonzentration 0,025/ $\mu\text{g/ml}$) versetzt wurde, überschichtet. Die weitere Inkubation erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen. Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurde aus jeder Schale das Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 2 ersichtlich. Der Metaphaseindex der nicht infizierten Kontrollzellen bewegt

sich in der Größenordnung von 45 %, was einer konstanten Zellteilung innerhalb des Beobachtungszeitraumes entspricht. Hingegen ist bei den infizierten Zellen ein steiler Anstieg des Metaphaseindex 2-3 Stunden nach Infektionsbeginn zu verzeichnen, welcher die Kontrollwerte um das Doppelte übertrifft.

Die mit Colcemide behandelten Reihen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Metaphasenzahl, wobei die mit VSV infizierte Reihe etwas höher als die entsprechende Kontrollreihe mit Zusatz von Colcemide liegt. Dieser Befund ist jedoch nicht signifikant. Während die Metaphaserate der infizierten Zellen (VSV) die der Kontrollzellen (K) um das Doppelte übertrifft, liegt die Metaphaserate der mit Zusatz von Colcemide behandelten und VSV infizierten Zellen (VSV Co) nur gering über der entsprechenden Kontrollreihe (KCo). Würde die Zunahme der Metaphaserate in der VSV infizierten Reihe (VSV) nur auf einer Mitosesteigerung beruhen, so müßte die Metaphaserate der mit Zusatz von Colcemide und infizierten Reihe (VSVCo) die entsprechende Kontrollreihe (KCo) in dem Maße übertreffen, wie die Metaphaserate der infizierten Reihe (VSV) die Kontrollreihe (K) übertrifft, nämlich um das Doppelte.

Da dies nicht der Fall ist, handelt es sich hierbei in erster Linie um einen Colchizin-ähnlichen Effekt.

Der Metaphaseindex der infizierten Zellen (VSV) steigt kontinuierlich an und erreicht $3^h 45'$ nach Infektionsbeginn etwa das Doppelte der Kontrollzellen. Dieser Colchizin-ähnliche Effekt ist nur partiell. Der Metaphaseindex der mit VSV infizierten Reihe (VSV) ist bis $3^h 45'$ annähernd gleich dem Metaphaseindex der mit Zusatz von Colcemide behandelten Kontrollzellen (KCo), wobei auch noch Zellen in die Telophase eintreten können (Abb. 3).

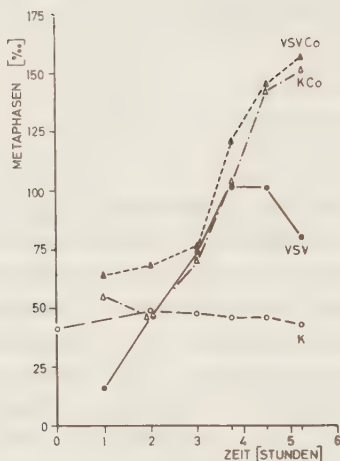


Abb. 2: Verhalten der Metaphasen in HEp-2 Zellen nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus und Zusatz von Colcemide.

- — : VSV infizierte HEp-2 Zellen (VSV)
- ▲ --- : VSV infizierte HEp-2 Zellen unter Einwirkung von Colcemide (VSVCo)
- — : nicht-infizierte HEp-2 Zellen (K)
- △ - - : nicht-infizierte HEp-2 Zellen unter Einwirkung von Colcemide (KCo)

Bei den mit VSV infizierten Zellen läßt sich nach Zugabe von Colcemide eine geringe nicht signifikante Mitosesteigerung annehmen (VSVCo, KCo). Während die Metaphaserate der infizierten Zellen (VSV) die der Kontrollzellen (K) um das Doppelte übertrifft, liegt die Metaphaserate der mit Zusatz von Colcemide behandelten und VSV infizierten Reihe (VSVCo) nur gering über der entsprechenden Kontrollreihe (KCo). Würde die Zunahme der Metaphaserate in der VSV infizierten Reihe (VSV) nur auf einer Mitosesteigerung beruhen, so müßte die Metaphaserate der mit Zusatz von Colcemide behandelten und infizierten Reihe (VSVCo) die entsprechende Kontrollreihe (KCo) in dem Maße übertreffen, wie die Metaphaserate der infizierten Reihe (VSV) die Kontrollreihe (K) übertrifft, nämlich um das Doppelte. Da dies nicht der Fall ist, handelt es sich hierbei in erster Linie um einen Colchizin-ähnlichen Effekt.

3^h 45' nach Infektionsbeginn erfolgt keine weitere Zunahme des Metaphaseindex der mit VSV infizierten Zellen (VSV). Das spricht - im Zusammenhang mit dem steilen Anstieg der Telophasenzahl (Abb. 3) - für eine teilweise Lösung der Arretierung der Metaphasen.

Das Ergebnis für die Telophasen ist aus der Abbildung 3 ersichtlich. Die Registrierung der Telophasen erfolgte in den Reihen der Kontrollzellen und der infizierten Zellen. Während sich die Zahl der Telophasen in der Kontrollreihe über den Beobachtungszeitraum annähernd konstant hält, nimmt die Zahl der Telophasen in der mit VSV infizierten Reihe stetig zu und erreicht am Ende des Beobachtungszeitraumes etwa das Zehnfache der Kontrollreihe.

Dieser Befund besagt, daß die VSV infizierten Zellen bis 3^h 45' eine weitgehende Arretierung in der Metaphase aufweisen (Colchizin-ähnlicher Effekt). Danach löst sich die Metaphasearretierung teilweise. Die in die Telophase übergehenden Zellen werden sodann endgültig arretiert und sammeln sich in der Telophase an. Dementsprechend sind diese Zellen erheblich morphologisch verändert. Die Rekonstitution der Kerne kommt nicht mehr zustande. Es finden sich hochgradige Kernpyknosen.

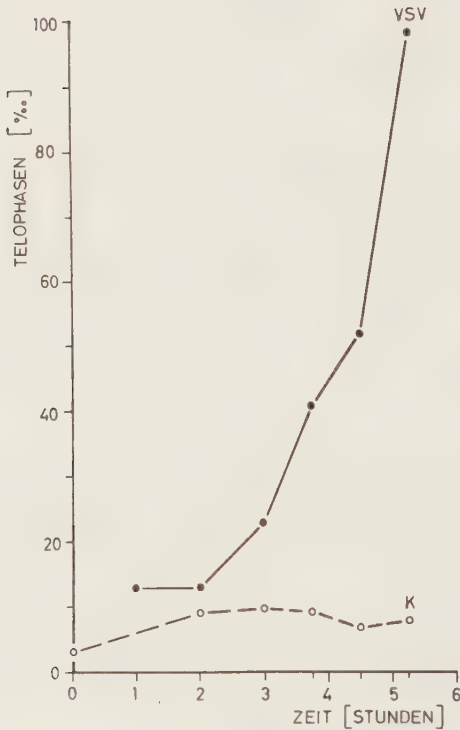


Abb. 3: Verhalten der Telophasen in HEP-2 Zellen nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus

- — : VSV infizierte HEP-2 Zellen (VSV)
- — : nicht infizierte HEP-2 Zellen (K)

Steiler Anstieg der Telophasen 3 Stunden nach Infektionsbeginn. Die infizierten Zellen, die die Telophase erreichen, werden in diesem Stadium arretiert.

3. Beziehungen zwischen Mitoseverhalten und zeitlichem Ablauf der Virusreproduktion

Um den Zusammenhang zwischen dem Mitoseverhalten und dem zeitlichen Ablauf der Virusreproduktion zu untersuchen, wurde in diesem Versuch der Ablauf der VSV-Reproduktion auf HEp-2 Zellen bestimmt.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen für 24 Stunden angezüchtet wurden. Das Virus wurde mit EAGLE MEM verdünnt und auf eine Konzentration von $2,1 \times 10^7$ PFU/ml gebracht. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt war, wurden als Inokulum je 2,0 ml pro Schale aufgegeben. Die Inokulation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 30 Minuten wurde jede Schale 3 mal mit je 3,0 ml EAGLE MEM 0 KS gewaschen. Anschließend wurde für weitere 30 Minuten EAGLE MEM 10 % KS zur Elution locker adsorbierter Viruspartikel aufgegeben. Darauf erfolgte eine zweite Waschung mit je 2 mal 3,0 ml EAGLE MEM 0 KS pro Petrischale. Anschließend wurden je 3,0 ml Erhaltungsmedium mit 10 % KS aufgegeben.

4 1/2 Stunden p.i. begann der CPE. Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden von jeder Schale das Gewebekulturüberstandsmedium entnommen und bis zur Titration bei -65°C eingefroren. Das Ausmaß der Virusreproduktion wurde nach der Plaque-Methode bestimmt und in PFU/ml angegeben.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 4 ersichtlich.

Nach einer Latenzperiode von 3,5 Stunden erfolgt ein logarithmischer Anstieg neusynthetisierter freigesetzter Viruspartikel, der um die 10. Stunde den Ausgangswert um etwa dreieinhalb Zehnerpotenzen übersteigt. Der Reproduktionsablauf entspricht dem Bild einer Einstufenwachstumskurve. Ein Vergleich mit den beiden vorhergehenden Versuchen zeigt, daß die Metaphasenveränderungen bereits vor der Freisetzung reifer Viruspartikel einsetzt.

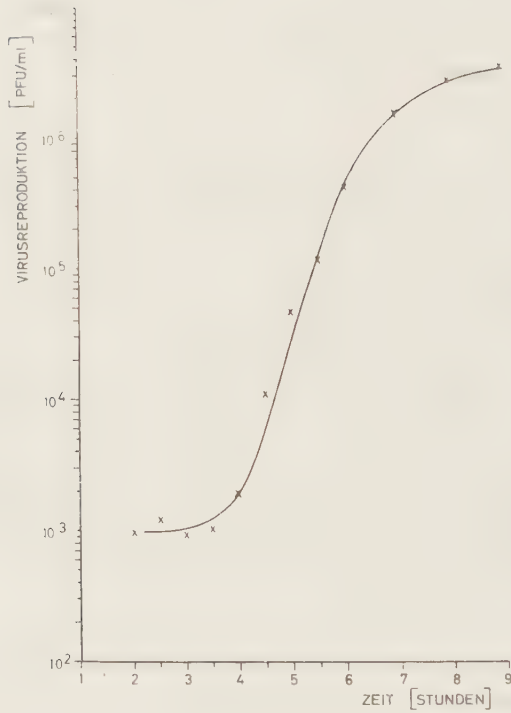


Abb. 4: Ablauf der Reproduktion von VSV in HEp-2 Zellen. Nach einer Latenzperiode von 3,5 - 4 Stunden erfolgt die Freisetzung reifer Viruspartikel. Die größte Ausbeute ist etwa von der 9. Stunde an erreicht.

B) Verhalten der Zellteilung Vesicular Stomatitis Virus-
infizierter Zellen unter der Einwirkung von Inhibitoren
der Virusreproduktion

1. Einfluß von Guanidin auf die Reproduktion von
Vesicular Stomatitis Virus

Da Guanidin als Hemmer der Reproduktion bestimmter RNS-haltiger Viren bekannt ist, sollte untersucht werden, ob Guanidin in dem von uns verwendeten System die Reproduktion von VSV hemmt. In einem Kontrollversuch wurde zunächst die bekannte Wirkung von Guanidin auf Polio-Virus (Stamm Mahoney) untersucht.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen für 24 Stunden angezüchtet waren. Zur Virusinfektion ($3,6 \times 10^7$ PFU/ml VSV in EAGLE MEM + 10 % KS) wurde Guanidin in den entsprechenden Konzentrationen beigelegt.

Zum Zeitpunkt 0 wurden die Schalen nach Absaugen des Kulturmediums mit je 2,0 ml Virusinokulum, das die entsprechende Guanidin-Konzentration enthielt, inokuliert und für 30 Minuten bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurde mit je 3,0 ml 3 mal das nicht adsorbierte Virus abgewaschen. Daraufhin erfolgte für weitere 30 Minuten die Elution, anschließend das 2. Waschen mit 2 mal 3,0 ml und die Aufgabe von je 3,0 ml Erhaltungsmedium pro Schale. Die Medien für Waschen, Elution und Erhaltung enthielten jeweils die entsprechenden Guanidin-Konzentrationen. Nach 17 Stunden wurde der Gewebekulturüberstand der Schalen gewonnen und bis zur Titration bei -65°C eingefroren.

Das Ergebnis ist aus der Tab. 1 ersichtlich. Wird die VSV-Reproduktion in HEp-2 Zellen ohne Inhibitor mit 100 % angesetzt, so erfolgt bei $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ Guanidin eine Hemmung der Virusreproduktion um 55 %. Im Vergleich dazu wird die VSV-Reproduktion auf Hühnerfibroblasten bei gleicher Guanidin-Konzentration um 87,8 % gehemmt, der Poliomyelitisvirus Stamm Mahoney auf HEp-2 Zellen um 99,96 %.

Hieraus folgt, daß durch Guanidin auf HEp-2 Zellen nur eine unzureichende Hemmung der VSV-Synthese zu erreichen ist. Das System ist somit für die geplanten Untersuchungen ungeeignet.

Virus	Zellart	Titer PFU/ml		Hemmung %
		Ø Guanidin	500 µg/ml Guanidin	
Polio (MAH)	HEp 2	$1,6 \times 10^8$	$5,3 \times 10^4$	99,96
VSV	HEp 2	$1,13 \times 10^7$	$6,2 \times 10^6$	55,6
	Hühner- fibrobl.	$2,7 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	87,8

Tabelle 1: Hemmung der Reproduktion von Polio-Virus
(Typ 1, Stamm Mahoney) und Vesicular Stoma-
titis Virus durch Guanidin.
Ausbeute 17 Stunden nach Infektionsbeginn.

2. Hemmung der Reproduktion von Vesicular Stomatitis Virus durch p-Fluoropnylalanin

Da der vorhergehende Versuch gezeigt hat, daß Guanidin keine ausreichende Hemmung der VSV-Reproduktion bewirkt, sollte FPA zur Hemmung der VSV-Reproduktion verwendet werden. Zunächst wurde untersucht, ob in diesem System eine für FPA charakteristische Hemmung vorhanden ist.

Es wurden HEP-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen für 24 Stunden angezüchtet waren. Dem zur Inokulation verwendeten Virus ($3,6 \times 10^7$ PFU/ml VSV in EAGLE MEM + 10 % KS) wurde FPA in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt. Für die Durchführung des Versuches wurde nur Phenylalaninfreies EAGLE-Medium verwendet. Zum Zeitpunkt 0 wurde das Kulturmedium abgesaugt und alle Schalen erhielten je 2,0 ml des Virusinokulum mit den entsprechenden FPA-Konzentrationen. Adsorption für 30 Minuten bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Danach wurde mit je 3,0 ml der entsprechenden FPA-Konzentration 3 mal das nicht adsorbierte Virus abgewaschen. Anschließend erfolgte für weitere 30 Minuten die Elution, gefolgt von der 2. Waschung mit 2 mal je 3,0 ml und der Aufgabe von je 3,0 ml Erhaltungsmedium. Die Medien für Waschen, Elution und Erhaltung enthielten jeweils wieder die entsprechenden FPA-Konzentrationen. Zu dem jeweiligen Untersuchungstermin wurde das Gewebekulturmedium je einer Schale geerntet und bis zur Titration bei -65°C eingefroren.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 5 ersichtlich. Mit zunehmender FPA-Konzentration nimmt das Ausmaß der Virusreproduktion ab. Oberhalb von $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ FPA erfolgt eine weitgehende Hemmung der VSV-Reproduktion (5-6 log 10).

3. Veränderungen im Mitoseablauf Vesicular Stomatitis Virus-infizierter Zellen nach Einwirkung von p-Fluorophenylalanin

In diesem Versuch sollte das Mitoseverhalten unter Bedingungen untersucht werden, in dem die VSV-Reproduktion durch FPA gehemmt wird. In der ersten Versuchsreihe

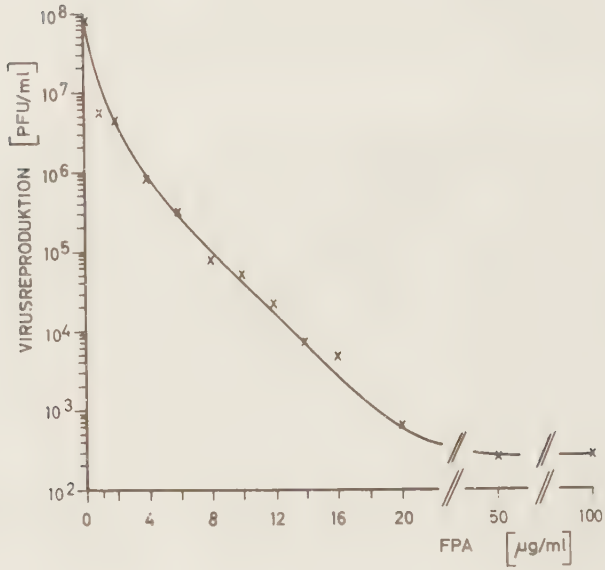


Abb. 5: Ausmaß der Reproduktion von VSV in HEp-2 Zellen 17,5 Stunden nach Infektionsbeginn in Abhängigkeit von der FPA-Konzentration. Weitgehende Hemmung der VSV-Reproduktion oberhalb einer Dosis von 20 µg/ml

wurden HEp-2 Zellen mit Vesicular Stomatitis Virus infiziert und gleichzeitig mit FPA in einer Konzentration von 25 µg/ml behandelt. Das Mitoseverhalten wurde von Infektionsbeginn an bis zum Einsetzen des cytopathischen Effektes untersucht.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angereicht waren. Zum Zeitpunkt 0 wurde das Kulturmedium abgesaugt und jeweils 2,0 ml des entsprechenden Inokulationsmediums aufgegeben. Es wurden dabei folgende Reihen aufgestellt: eine Kontrollreihe, eine Kontrollreihe mit Zugabe von FPA, eine Reihe virusinfizierter Zellen und eine Reihe, die neben der Virusinfektion gleichzeitig mit FPA behandelt wurde. Das Virus ($2,5 \times 10^7$ PFU/ml in EAGLE MEM mit 10 % KS) wurde mit den entsprechenden Medien verdünnt. Die Inokulation erfolgte mit den entsprechenden Medien für 30 Minuten bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurde das Inokulum von allen Schalen abgesaugt (Virus und Kontrollen) und mit je 5,0 ml des entsprechenden Erhaltungsmediums beschickt. Die weitere Inkubation erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen. Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurde aus jeder Schale ein Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis für die Metaphasen ist aus der Abb. 6 ersichtlich. Die Kontrollzellen haben über den gesamten Beobachtungszeitraum einen annähernd gleichen Metaphaseindex, der einer annähernd konstanten Zellteilung entspricht. Demgegenüber steigt die Metaphaserate der Virusinfizierten Zellen an und hat in der 3. Stunde etwa das Doppelte der Kontrollzellen erreicht. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis auf Seite 16, Abb. 2. Die Metaphaserate der Kontrollzellen, die mit FPA behandelt worden sind, steigt während des ganzen Beobachtungszeitraumes kontinuierlich an und hat am Ende der Beobachtungszeit ungefähr das Dreifache der Kontrollzellen erreicht. Die Metaphaserate der Virusinfizierten und zugleich mit FPA behandelten Zellen zeigt gegenüber den anderen Reihen einen besonders steilen

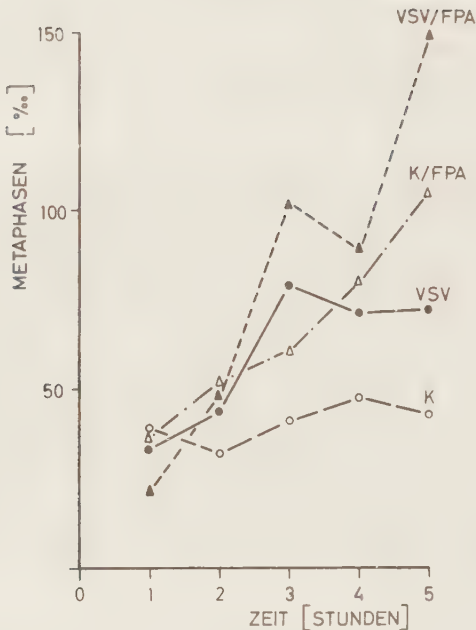


Abb. 6: Verhalten der Metaphasen in HEp-2 Zellen nach der Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus und Behandlung mit p-Fluorophenylalanin

- ——— : VSV infizierte Zellen (VSV)
- ▲ ——— : VSV infizierte Zellen behandelt mit FPA (VSV/FPA)
- ——— : nicht infizierte Kontrollzellen (K)
- △ ——— : nicht infizierte Kontrollzellen behandelt mit FPA (K/FPA)

Inokulation zum Zeitpunkt 0. Annähernd gleichmäßiges Wachstum der Kontrollzellen (K). Die mit VSV infizierte Zellreihe (VSV) zeigt das bekannte Verhalten (Abb. 2). Die Metaphaserate der mit FPA behandelten Kontrollzellen (K/FPA) steigt ebenso kontinuierlich während des Beobachtungszeitraumes an, wie die Metaphaserate der mit VSV infizierten und mit FPA behandelten Zellen (VSV/FPA). Die größte Zunahme der Metaphaserate erfährt dabei die Reihe der Zellen, die mit VSV infiziert und mit FPA behandelt wurden (VSV/FPA). Dieser Befund besagt, daß bereits FPA allein eine Zunahme der Metaphasen bewirkt. Werden VSV infizierte Zellen mit FPA behandelt, so scheinen sich die VSV-bedingte und die FPA-bedingte Metaphasenzunahme zu addieren.

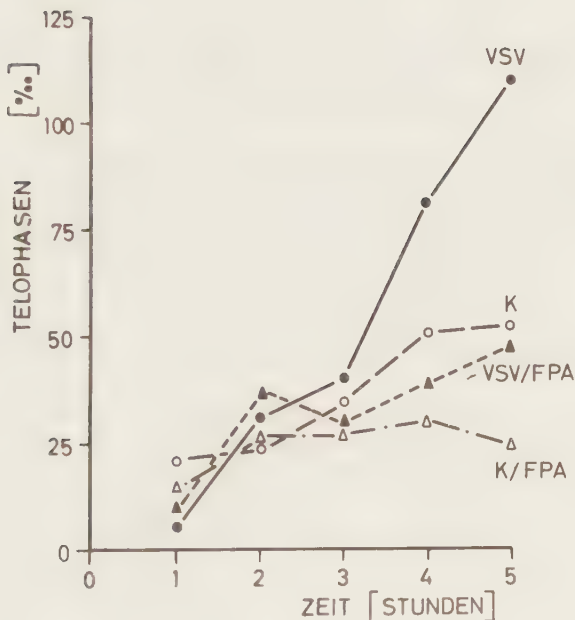


Abb. 7: Verhalten der Telophasen in HEp-2 Zellen nach Infektion mit Vesicular Stomatitis Virus und der Behandlung mit p-Fluorophenylalanin

- ——— : VSV infizierte Zellen (VSV)
- ▲ - - - - : VSV infizierte Zellen behandelt mit FPA (VSV/FPA)
- ——— : nicht infizierte Kontrollzellen (K)
- △ - · - · : nicht infizierte Kontrollzellen behandelt mit FPA (K/FPA)

Die Telophasen der mit VSV infizierten Reihe (VSV) zeigen das im Abschnitt A beschriebene Verhalten (Abb. 3). In der Zellreihe der Kontrollzellen (K), in den mit Zusatz von FPA behandelten Kontrollzellen (K/FPA) und in der Reihe mit VSV infizierten und mit FPA behandelten Zellen (VSV/FPA) kommt es zu keinem Anstieg der Telophaserate. Im Zusammenhang mit dem Verhalten der Metaphasen ergibt sich daraus, daß sich in der mit VSV infizierten und mit FPA behandelten Zellreihe die durch VSV und FPA bedingten Effekte zu addieren scheinen.

Anstieg und erreicht am Ende der Beobachtungszeit annähernd das Sechsfache der Kontrollkulturen. Hieraus folgt, daß bereits durch FPA allein eine Zunahme der Metaphasen erfolgt. Werden VSV infizierte Zellen mit FPA behandelt, so scheinen sich die VSV-bedingte und die FPA-bedingte Metaphasezunahme zu addieren.

Aus der Abb. 7 ist das Ergebnis für die Telophasen ersichtlich. Die Telophasen in VSV infizierten Zellen zeigen den typischen Anstieg gegenüber der Kontrollkultur (s. auch Abb. 3). Nach Zusatz von FPA bleibt in den mit VSV infizierten Zellen die Zahl der Telophasen in der Größenordnung der Kontrollkulturen. Ebenso ist das Verhalten der lediglich mit FPA behandelten Zellen.

Mit diesem Versuch konnte das Verhalten der Metaphasen und der Telophasen der mit VSV infizierten Zellen, wie es die Abb. 2 und Abb. 3 zeigen, bestätigt werden. Es zeigt sich aber auch, daß durch die Zugabe von FPA eine Zunahme der Metaphaserate zu beobachten ist, die am Ende des Beobachtungszeitraumes die Metaphasezahl der Kontrollzellen um das Doppelte übertrifft. Da keine Zunahme der Telophasezahl in der mit Zugabe von FPA behandelten Zellen erfolgt, ist die Zunahme der Metaphasen in der gleichen Reihe auf einen partiellen Colchizin-ähnlichen Effekt zurückzuführen. Ob gleichzeitig eine Mitosesteigerung erfolgt, ist nicht zu entscheiden.

Die mit VSV infizierte und mit FPA-Zugabe behandelte Zellreihe zeigt die größte Zunahme der Metaphasen. Die Telophasen hingegen zeigen keinen Anstieg. Daraus ergibt sich, daß sich in dieser Reihe der virusbedingte und der FPA-bedingte partielle Colchizin-ähnliche Effekt addiert.

C) Verhalten nichtinfizierter Zellen unter der Einwirkung von p-Fluorophenylalanin

1. Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes und einer geringen Mitosesteigerung in den ersten Stunden der Einwirkung von p-Fluorophenylalanin

Aus den im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Versuchsergebnissen hatte sich ergeben, daß nicht nur in den mit VSV infizierten Zellen die Metaphasezahl zunimmt, sondern auch bei der mit FPA-Zusatz behandelten Zellreihe. Deshalb sollte in den folgenden Versuchen der Einfluß von FPA auf das Mitoseverhalten untersucht werden. In parallelen Reihen wurden durch Colcemide-Zusatz die in der Mitose befindlichen Zellen in der Metaphase arretiert. Neben einer Verminderung des Registrierfehlers konnte gleichzeitig geklärt werden, ob durch FPA eine echte Vermehrung der Zellteilung stattfindet, oder ob dem FPA ein Colchizin-ähnlicher Effekt zukommt. In einem ersten Versuch wurden die Mitosen bis zu $6 \frac{1}{4}$ Stunden nach der Inokulation beobachtet.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. FPA wurde in einer Endkonzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ verwendet. Für die Medien der Versuchsreihe, in denen FPA untersucht wurde, wurde Phenylalanin-freies EAGLE-Medium verwendet. Zum Zeitpunkt 0 wurde das Kulturmedium der Schalen abgesaugt und auf 5 Schalen je 5,0 ml des entsprechenden Mediums aufgegeben. Das weitere Zellwachstum erfolgte bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Zu den jeweiligen Untersuchungsterminen wurde aus je 1 Schale ein Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt. Zum Zeitpunkt 0 wurde bereits ein Kontrollpräparat entnommen.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 8 ersichtlich. Die Metaphaserate der Kontrollzellen liegt bei 45 o/oo,

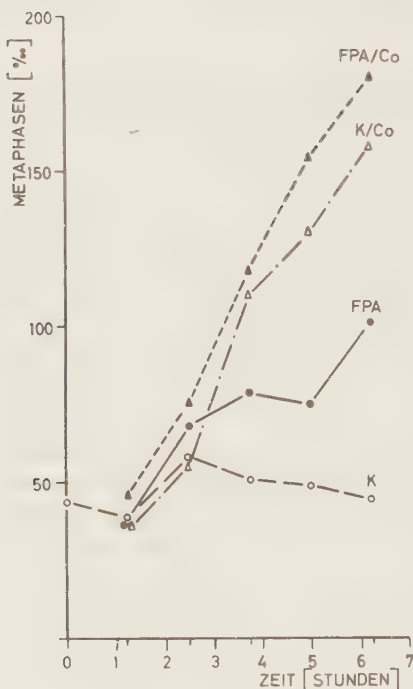


Abb. 8: Geringe Mitosesteigerung und partieller Colchizin-ähnlicher Effekt nach Behandlung mit Fluorophenylalanin

- — : FPA behandelte Zellen (FPA)
- ▲ --- : FPA und Colcemide behandelte Zellen (FPA/Co)
- — : Kontrollzellen (K)
- △ - - : Kontrollzellen mit Colcemide (K/Co)

Zunahme der Metaphaserate unter FPA-Zugabe im Vergleich zu den Kontrollzellen (Reihe FPA, Reihe K). FPA-Zusatz bewirkt einen partiellen Colchizin-ähnlichen Effekt, da die Metaphasenzahl dieser Zellreihe (FPA) höher liegt, als die Metaphasenzahl der Kontrollzellen (K), aber nicht so hoch, wie die der mit Colcemide-Zusatz behandelten Kontrollzellen (K/Co). Der Zusatz von FPA bewirkt außerdem eine geringe Mitosesteigerung, denn die Metaphasenzahl der mit FPA- und Colcemide-Zusatz behandelten Zellen (FPA/Co) liegt über der mit Colcemide behandelten Kontrollzellen (K/Co).

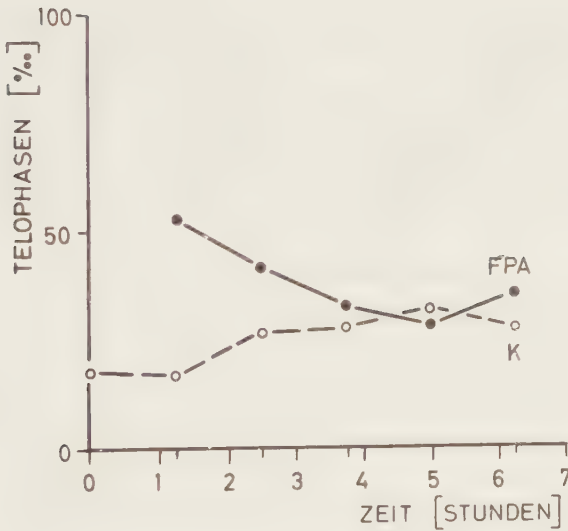


Abb. 9: Verhalten der Telophasen in HEp-2 Zellen unter dem Einfluß von FPA im Vergleich zu Kontrollzellen.

○ — : Kontrollzellen (K)

● — : FPA behandelte Zellen (F)

Die Telophasenrate ist in beiden Kurven annähernd gleich.

was einer annähernd konstanten Zellteilung während des Beobachtungszeitraumes entspricht.

Demgegenüber ist ein Anstieg der Metaphaserate in der mit FPA-Zusatz behandelten Zellreihe zu verzeichnen, der am Ende des Beobachtungszeitraumes die Kontrollwerte um etwa das Doppelte übertrifft. Die mit Colcemide behandelten Reihen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Metaphaserate, wobei die Kurve der mit FPA behandelten Reihe gering über der der Kontrollzellen liegt. Würde die Zunahme der Metaphaserate in der mit FPA behandelten Reihe (FPA) nur auf einer Mitosesteigerung beruhen, so müßte die Metaphaserate der mit Zusatz von Colcemide und FPA behandelten Reihe (FPA/Co) die entsprechende Kontrollreihe (K/Co) in dem Maße übertreffen, wie die Metaphaserate der mit FPA behandelten Zellreihe (FPA) die Kontrollreihe (K) übertrifft, nämlich um das Doppelte. Da das nicht der Fall ist, handelt es sich hierbei in erster Linie um einen partiellen Colchizin-ähnlichen Effekt. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer geringen Mitosestimulierung, denn die mit FPA und Colcemide behandelte Zellreihe (FPA/Co) liegt über der der mit Colcemide behandelten Kontrollzellen (KCo).

Das Ergebnis für die Telophasen ist aus der Abb. 9 ersichtlich. Das Verhalten der Telophasen in den Kontrollzellen ist gleich der mit FPA behandelten Zellen. Der partielle Colchizin-ähnliche Effekt erstreckt sich nur auf die Metaphasen.

2. Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes nach längerer Einwirkung von Fluorophenylalanin

Mit diesem Versuch sollte geklärt werden, welchen Einfluß FPA auf die Zellteilung hat, nachdem es bereits

6.5 Stunden auf die Zellen eingewirkt hatte.

Es wurden HFp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. Die FPA-Endkonzentration betrug wie der 25 $\mu\text{g/ml}$. Parallele Versuchsreihen wurden ebenfalls mit Colcemide behandelt. Das Nährmedium der unter FPA-Einfluß stehenden Versuchsreihen war Phenylalanin-frei. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde die eine Hälfte der Schalen, nachdem das Kulturmedium abgesaugt war, mit FPA-haltigem, die andere Hälfte mit FPA-freiem Medium beschickt und 5 Stunden bei 37° C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden zu je einer Hälfte der jeweiligen Reihen Colcemide (Endkonzentration 0,025 $\mu\text{g/ml}$) hinzugegeben. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde aus je einer Schale das Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt. Die maximale Einwirkungsdauer von FPA betrug 12,5 Stunden.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 10 ersichtlich. Der Metaphaseindex der nicht mit FPA behandelten Kontrollzellen beträgt annähernd 30 o/oo über den ganzen Zeitraum hin und entspricht damit einer konstanten Zellteilung. Das Verhalten der Metaphasen FPA-behandelter Zellen ist analog, nur liegt hierbei der Index etwa doppelt so hoch, und zwar bei 55 o/oo. Die mit Colcemide behandelten Vergleichsreihen ergeben, daß der Metaphaseindex der mit FPA behandelten Zellen in der 6,5. bis 8. Stunde noch deutlich über dem der Colcemide behandelten Kontrollzellen liegt, danach jedoch zurückgeht und unter dem der nicht mit FPA behandelten Zellen liegt.

Hieraus folgt, daß nach längerer FPA-Einwirkung der durch FPA bedingte Effekt der Mitosesteigerung nicht mehr zur Wirkung kommt, denn die Metaphaserate der mit FPA- und Colcemide-Zusatz behandelten Reihe liegt deutlich unter der mit Colcemide-Zusatz behandelten Kontrollreihe. Der Colchizin-ähnliche Effekt bleibt jedoch bestehen oder nimmt sogar noch etwas zu.

Das Verhalten der Telophasen ist aus der Abb. 11 ersichtlich. Die Telophasen der mit FPA-Zusatz behandel-

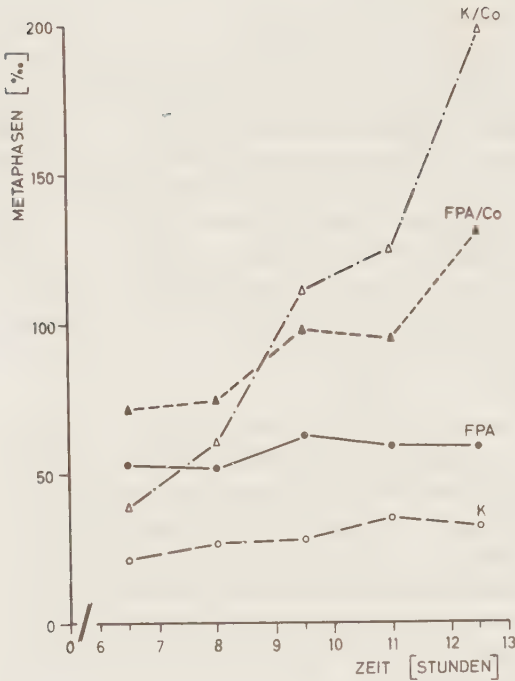


Abb. 10: Verhalten der Metaphasen in HEP-2 Zellen nach länger dauernder Einwirkung von Fluorophenylalanin und Zusatz von Colcemide.

- — : FPA behandelte Zellen (FPA)
- ▲ --- : FPA und Colcemide behandelte Zellen (FPA/Co)
- — : Kontrollzellen (K)
- △ - · - : Kontrollzellen behandelt mit Colcemide (K/Co)

Nach länger dauernder Einwirkung von FPA geht die durch FPA bedingte Mitosesteigerung zurück (ab der 9. Stunde FPA/Co niedriger als K/Co). Der partielle Colchizin-ähnliche Effekt bleibt jedoch bestehen (Reihe FPA höher als Reihe K) und nimmt gegen Ende des Versuches noch etwas zu (Abnahme der Relation FPA/Co zu FPA).

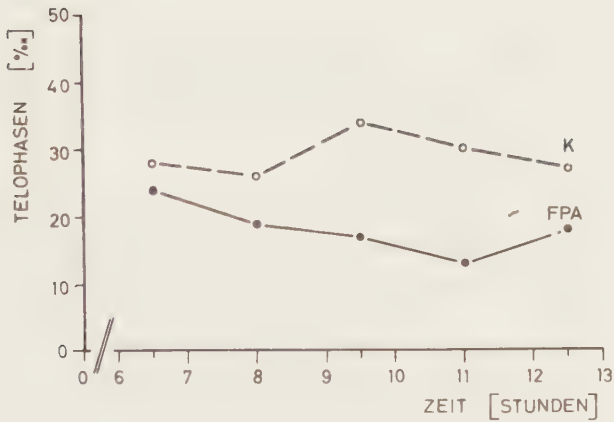


Abb. 11: Verhalten der Telophasen in HEp-2 Zellen nach länger dauernder Einwirkung von Fluorophenylalanin.

● — : FPA behandelte Zellen (FPA)
○ — : Kontrollzellen (K)

Gleiches Verhalten der Telophasen in den Kontrollzellen und in den mit FPA behandelten Zellen.

ten Zellen verhalten sich ebenso wie die Telophasen der Kontrollzellen. Die Verminderung der Reihe "FPA" ist nicht signifikant.

D) Unterschiedliche Einwirkung von p-Fluorophenylalanin auf die Zellteilung in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors

In diesem Versuch wurde untersucht, ob der in den vorhergehenden Versuchen beobachtete Colchizin-ähnliche Effekt und die leichte Mitosesteigerung abhängig ist von der FPA-Konzentration.

Es wurden HEP-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. FPA wurde in folgenden Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) verwendet: 0, 5, 10, 15, 25, 35, 50, 100, 200 und 500. In einer analogen Versuchsreihe wurde allen Schalen zusätzlich Colcemide in einer Endkonzentration von $0,025 \mu\text{g/ml}$ zugegeben. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde das Kulturmedium aller Schalen abgesaugt und je 5,0 ml des entsprechenden FPA-haltigen bzw. FPA- und Colcemide-haltigen Mediums aufgegeben. Das weitere Wachstum der Zellen erfolgte bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 6 Stunden wurden alle Deckgläser aus den Petrischalen entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 12 ersichtlich. Danach nimmt 6 Stunden nach der FPA-Zugabe der Metaphaseindex der mit FPA behandelten Zellen (FPA) kontinuierlich zu und erreicht bei $25 \mu\text{g/ml}$ einen Gipfel, um dann bei höheren Konzentrationen gering abzufallen und bis zu $200 \mu\text{g/ml}$ in gleicher Höhe zu bleiben. Bei $500 \mu\text{g/ml}$ liegt gegenüber $200 \mu\text{g/ml}$ der Metaphaseindex deutlich niedriger. Die Kurve der Metaphasezahl der mit FPA und Colcemide behandelten Zellen (FPA/Co) zeigt ebenso einen kontinuierlichen Anstieg und erreicht einen analogen Gipfel bei $25 \mu\text{g/ml}$. Bei den folgenden höheren FPA-Ko

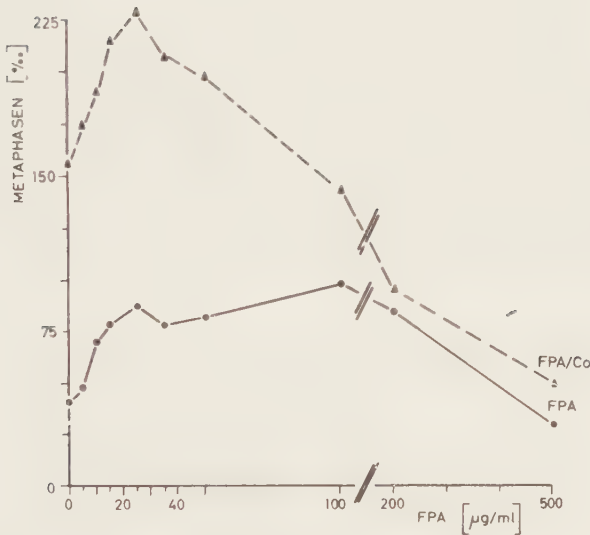


Abb. 12: Verhalten der Metaphasen in HEP-2 Zellen nach sechsstündiger Einwirkung verschiedener Fluorophenylalanin-Konzentrationen

- — : FPA behandelte Zellen ohne Zusatz von Colcemide (FPA)
- ▲ --- : FPA behandelte Zellen mit Zusatz von Colcemide (FPA/Co)

FPA in niedrigen Konzentrationen bewirkt neben einem Colchizin-ähnlichen Effekt eine echte geringe Mitosesteigerung. Bei höheren FPA-Konzentrationen - von 30 bis zu 200 $\mu\text{g/ml}$ - steht der Colchizin-ähnliche Effekt im Vordergrund. Extrem hohe FPA-Konzentrationen bewirken eine Mitosehemmung.

zentrationen nimmt der Metaphaseindex langsam ab. Bei einer FPA-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ kommt es zu einer Annäherung beider Kurven. Damit wurde bestätigt, daß durch niedrige FPA-Konzentrationen neben einem Colchizin-ähnlichen Effekt eine echte Mitosesteigerung bewirkt wird. Bei höheren Konzentrationen tritt die Mitosesteigerung in den Hintergrund und der Colchizin-ähnliche Effekt steht im Vordergrund. Bei extrem hohen Konzentrationen überwiegt die mitosehemmende Wirkung.

Das Ergebnis wurde in 2 weiteren, unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungsversuchen jeweils identisch bestätigt.

E) Verhalten nichtinfizierter Zellen unter der Einwirkung von Puromycin

1. Die Abhängigkeit der Wirkung von Puromycin von der Dosis

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob Puromycin, als Proteinsyntheseinhibitor, der direkt am Ribosom angreift, einen Effekt auf die Metaphaserate hat. Dabei wurde in analoger Weise zu den Versuchen mit FPA verfahren.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. Puromycin wurde in folgenden Konzentrationen verwendet: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30 und 40 $\mu\text{g/ml}$. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde von allen Petrischalen das Kulturmedium abgesaugt und je 5,0 ml Medium mit den entsprechenden Puromycin-Konzentrationen aufgegeben und das weitere Wachstum erfolgte bei 37⁰ C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 6 Stunden wurden aus allen Schalen die Deckgläser entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 13 ersichtlich. Der Metaphaseindex nimmt bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin gegenüber der Kontrolle zu, um dann kontinuierlich abzufallen, so daß bei 6,0 $\mu\text{g/ml}$ annähernd eine vollständige Hemmung der Mitose besteht, die bei allen weiteren Puromycin-Konzentrationen anhält.

Aus diesem Versuch ist nicht zu entscheiden, ob der bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$ beobachtete Anstieg des Metaphaseindex auf eine echte Mitosesteigerung zurückzuführen ist, oder ob es sich dabei um einen Colchizin-ähnlichen Effekt handelt. Es sollte zunächst die Abhängigkeit des Effektes von der Substanzkonzentration genauer bestimmt werden.

In Anlehnung an den vorhergehenden Versuch wurde untersucht, welchen Einfluß Puromycin in niedrigeren Konzentrationen auf die Zellteilung hat. Im einzelnen wurden dabei folgende Puromycin-Konzentrationen verwendet: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 und 10,0 $\mu\text{g/ml}$.

Die Durchführung des Versuches erfolgte wie im vorherigen beschrieben.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 14 ersichtlich. Der Metaphaseindex nimmt kontinuierlich zu und erreicht bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ den Gipfel, um danach langsam abzufallen, so daß bei 6,0 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin kaum noch Mitosen stattfinden. Mit diesem Versuch konnte der Anstieg des Metaphaseindex bestätigt werden, sein Maximum liegt bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin.

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob dieser Anstieg auf einem Colchizin-ähnlichen Effekt oder auf einer Mitosesteigerung beruht.

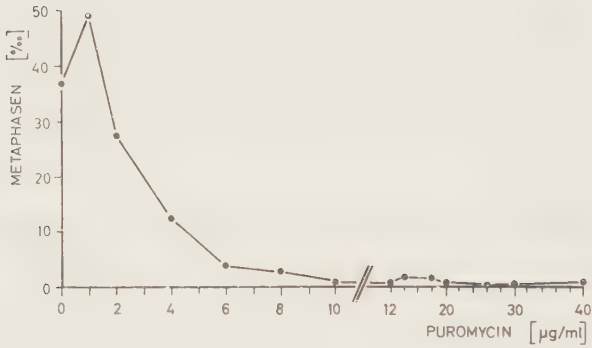


Abb. 13: Verhalten der Metaphasen in HEP-2 Zellen unter dem sechsstündigen Einfluß verschiedener Puromycin-Konzentrationen

Anstieg der Metaphasezahl bei 1,0 µg/ml Puromycin. Es ist nicht ersichtlich, ob es sich um eine echte Mitosesteigerung, einen Colchizin-ähnlichen Effekt oder um beides handelt.

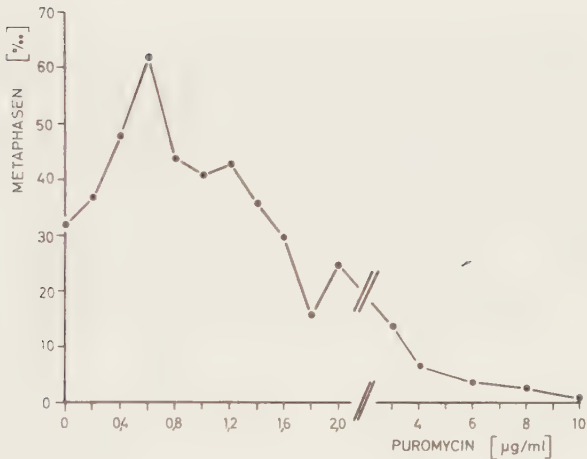


Abb. 14: Verhalten der Metaphasen in HEP-2 Zellen nach
sechstündigem Einfluß verschiedener Puromycin-
Konzentrationen

Anstieg der Metaphaserate mit einem Maximum bei 0,6 µg/ml
Puromycin, ohne daß damit entschieden werden kann, ob es
sich dabei um eine echte Mitosesteigerung oder um einen
Colchizin-ähnlichen Effekt handelt.

2. Verhalten der Mitose unter dem Einfluß von Puromycin

Bei dem vorliegenden Versuch wurden durch Colcemide-Zugabe die Metaphasen arretiert, um eine Mitosesteigerung von einem Colchizin-ähnlichen Effekt unterscheiden zu können.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angestrichet waren. Puromycin wurde in folgenden Konzentrationen verwendet: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 und 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Die gleichen Konzentrationen wurden in einer Vergleichsreihe unter Colcemide-Zugabe von 0,025 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch das Medium mit der entsprechenden Puromycin-Verdünnung ersetzt, in der Vergleichsreihe wurde die mit gleichen Colcemide-Konzentrationen versetzte Puromycin-Verdünnung aufgegeben. Das weitere Zellwachstum erfolgte bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 6 Stunden wurde aus allen Schalen das Deckgläschen entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Faulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 15 ersichtlich. Die Zahl der Metaphasen nimmt unter steigender Puromycin-Konzentration zu und erreicht - wie in dem vorhergehenden Versuch (Abb. 14) - bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ einen Gipfel, der den Ausgangswert um annähernd das Doppelte übertrifft. Bei höheren Puromycin-Konzentrationen nimmt die Metaphaserate langsam ab, so daß bei 1,5 $\mu\text{g/ml}$ fast eine komplette Hemmung der Mitose besteht. Demgegenüber bildet die Metaphaserate der mit Colcemide behandelten Vergleichsreihe keinen Gipfel, sondern fällt kontinuierlich von dem am höchsten liegenden Ausgangswert ab. Bei 1,5 $\mu\text{g/ml}$ kommt es zu einer Annäherung der beiden Kurven.

Hieraus würde folgen, daß der mit dem Maximum bei einer Puromycin-Konzentration von 0,6 $\mu\text{g/ml}$ beobachtete Anstieg der Metaphaserate auf einen partiellen Colchizin-

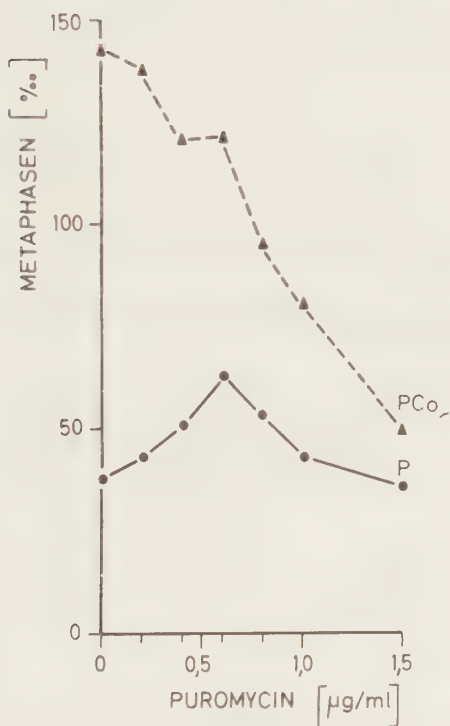


Abb. 15: Verhalten der Metaphasen in HEP-2 Zellen nach sechsständiger Einwirkung verschiedener Puromycin-Konzentrationen im Vergleich mit gleichzeitiger Zugabe von Colcemide.

- — : Puromycin behandelte Zellen ohne Zusatz von Colcemide (P)
- ▲ --- : Puromycin behandelte Zellen mit Zusatz von Colcemide (PCo)

Anstieg der Metaphasezahl bei 0,6 µg/ml Puromycin.

Kontinuierlicher Abfall der mit Puromycin und Colcemide behandelten Vergleichsreihe.

ähnlichen Effekt beruht, gleichzeitig aber schon bei dieser Konzentration eine Mitosehemmung zu verzeichnen ist, die dann bei höheren Puromycin-Konzentrationen immer mehr in den Vordergrund tritt.

In einem zweiten Versuch wurde das Ergebnis des vorhergehenden Versuches kontrolliert und bestätigt.

Wie in dem nächsten Versuch gezeigt wird, liegt diesem Ergebnis eine methodische Unzulänglichkeit zugrunde.

3. Verhalten Puromycin-behandelter Zellen unter dem Einfluß von Colcemide

In diesem Versuch sollte der Einfluß von einer Puromycin-Konzentration auf den Mitoseablauf in einem Beobachtungszeitraum von 8 Stunden untersucht werden. Puromycin wurde dabei in einer Endkonzentration von $0,6 \mu\text{g/ml}$ verwendet. Zum Vergleich wurden Zellen in nicht Puromycin-haltigen Medien untersucht. Gleichzeitig wurde je eine Reihe von Kontrollzellen und eine Reihe Puromycin-behandelter Zellen mit Colcemide in einer Endkonzentration von $0,025 \mu\text{g/ml}$ versetzt.

Es wurden HEp-2 Zellen verwendet, die in Falcon-Petrischalen mit eingelegten Deckgläsern für 24 Stunden angezüchtet waren. Zum Zeitpunkt 0 des Versuches wurde das Kulturmedium aller Schalen abgesaugt und je 5,0 ml des entsprechenden Mediums aufgegeben. Das weitere Wachstum erfolgte bei 37°C , 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Zum jeweiligen Versuchstermin wurde aus den Schalen das Deckglas entnommen, kurz in PBS gespült, fixiert und nach Feulgen gefärbt.

Das Ergebnis ist aus der Abb. 16 ersichtlich. Während der Metaphaseindex der Kontrollzellen mit 20 o/oo annähernd gleich bleibt, steigt die Mitoserate der mit Puromycin behandelten Zellen langsam an und beträgt

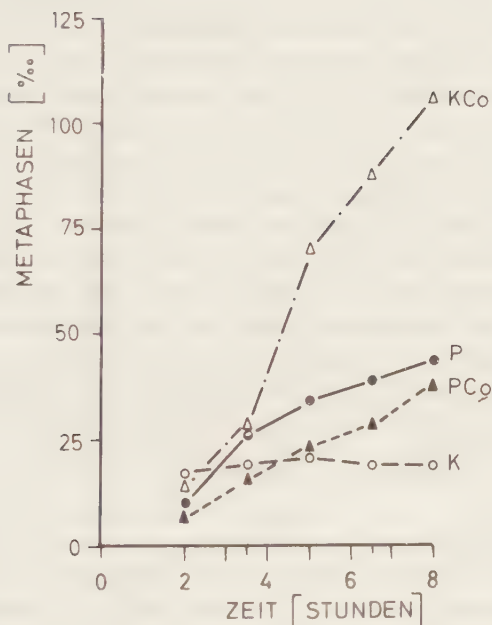


Abb. 16: Verhalten der Metaphasen in HEp-2 Zellen unter dem Einfluß von Puromycin und Colcemide.

- ——— : mit Puromycin behandelte Zellen (P)
- ▲ ——— : mit Puromycin und Colcemide behandelte Zellen (PCo)
- ——— : Kontrollzellen (K)
- Δ ——— : Kontrollzellen behandelt mit Colcemide (KCo)

Trotz einer erhöhten Metaphasezahl der mit Puromycin behandelten Zellreihe gegenüber der Kontrollzellreihe, weist nach Colcemide-Zusatz diese Reihe (PCo) eine niedrigere Metaphaserate auf, als die nur mit Puromycin behandelte Zellreihe. Das ist nur so zu erklären, daß unter gleichzeitiger Puromycin- und Colcemide-Behandlung die Zellen schlecht auf dem Deckglas haften und bei der histologischen Behandlung teilweise abgespült werden.

am Ende des Beobachtungszeitraumes etwa das Doppelte. Der Metaphaseindex der mit Zusatz von Colcemide behandelten Kontrollzellen nimmt stetig zu. Im Gegensatz hierzu liegt die Metaphaserate mit der Puromycin und Colcemide behandelten Zellen unterhalb der lediglich mit Puromycin behandelten Zellen. Dieser Befund beruht auf einem methodischen Fehler, denn es ist nicht möglich, daß der Metaphaseindex der mit Puromycin und Colcemide behandelten Zellen kleiner ist, als der Metaphaseindex der nur mit Puromycin behandelten Zellen. Dies ist nur so zu erklären, daß die Zellen eine gleichzeitige Behandlung mit Colcemide und Puromycin nicht vertragen. Sie haften schlecht am Deckglas und werden bei der histologischen Behandlung teilweise abgespült. So kann die wahre Zahl der in die Metaphase eingetretenen Zellen nicht ermittelt werden.

Im Falle der Behandlung mit Puromycin muß zunächst noch offen bleiben, ob die nach Zugabe von $0,6 \mu\text{g/ml}$ beobachtete Metaphasezunahme auf einer Mitosestimulierung oder auf einen Colchizin-ähnlichen Effekt beruht.

IV. Diskussion

Nach Infektion von HEP-2 Zellen mit VSV kommt es in den ersten Stunden nach Infektionsbeginn zu einer geringen Steigerung der Zellteilung. Gleichzeitig tritt ein teilweiser Colchizin-ähnlicher Effekt auf. Die mit Colcemide behandelten Zellen zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Metaphasen. Dabei ist der Metaphaseindex der mit VSV infizierten Reihe etwas höher als der entsprechenden Kontroll-Colcemide-Reihe (Abb. 1 u. 2). Hieraus folgt, daß in der mit VSV infizierten Reihe eine gewisse Mitosesteigerung erfolgt. Diese Mitosesteigerung ist jedoch gering.

Während in den ersten Stunden nach Infektionsbeginn die Anzahl der Metaphasen der infizierten Zellen die Kontrollzellen um das Doppelte übertrifft, liegt die Metaphaserate der mit Colcemide behandelten und infizierten Zellen nur gering über der mit Colcemide behandelten Kontrollreihe. Würde die in den mit VSV infizierten Zellen beobachtete Zunahme der Metaphasen auf einer echten Mitosesteigerung beruhen, so müßte die mit Colcemide behandelte und infizierte Reihe die entsprechende lediglich mit Colcemide behandelte Kontrollreihe um das Doppelte übertreffen. Hieraus folgt, daß der Anstieg des Metaphaseindex der mit VSV infizierten Zellreihe nur zum Teil auf einer echten Mitosesteigerung beruht. Gleichzeitig tritt ein Colchizin-ähnlicher Effekt auf. Dieser Effekt ist nur partiell. Denn trotz der beschriebenen Hemmung im Metaphasenablauf treten noch im geringen Ausmaß Zellen aus der Metaphase in die Telophase ein.

Auch bezüglich der Telophase zeigt sich eine weitere Störung im Mitoseablauf. Die Mehrzahl der aus der Metaphase in die Telophase übergetretenen Mitosen werden blockiert

und sammeln sich im Stadium der Telophase an (Abb. 3). Diese Zellen sind erheblich morphologisch verändert. Die Rekonstitution der Kerne kommt nicht mehr zustande, und es finden sich hochgradige Kernpyknosen. Im Zusammenhang mit dem Verhalten der Metaphasen der infizierten Zellreihe, bei denen nur in den ersten Stunden nach Infektionsbeginn eine kontinuierliche Zunahme zu verzeichnen ist, spricht der Anstieg der Telophasenzahl in den späteren Stunden für eine teilweise Lösung des Colchizin-ähnlichen Effektes.

Es ergab sich die Frage, ob für die Störungen des Mitoseablaufes der vollständige Ablauf der Virusinfektion erforderlich ist. Da erwartungsgemäß auch in unserem System mit Guanidin keine ausreichende Hemmung der VSV-Reproduktion zu erreichen war (Tab. 1), wurden DL-p-Fluorophenylalanin (FPA) und Puromycin als Inhibitoren verwendet.

FPA ist bekannt als wirkungsvoller Inhibitor der Virus-Synthese (ZIMMERMANN et al (1960; LEVINTOW et al (1961); SCHOLTISSEK et al. (1961); WECKER et al. (1961); ACKERMANN et al. (1964)). Wie in Abb. 5 gezeigt, wird in dem hier verwendeten Wirt-Virussystem die Reproduktion des VSV durch 20 µg FPA/ml um mehr als 5 Log₁₀ vermindert. Obwohl diese Dosis von den Zellen gut vertragen wird, konnte dieser Inhibitor für die Fragestellung nicht verwendet werden. Es zeigte sich nämlich, daß FPA in diesem Dosisbereich ganz bestimmte Mitoseveränderungen macht, die sich mit dem virusbedingten Mitoseeffekt überlagern.

Wie die Abb. 6 zeigt, ist der Metaphaseindex der mit FPA behandelten Zellen größer als in unbehandelten Kontrollzellen. Ein noch stärkerer Anstieg des Metaphaseindex ist in der mit FPA behandelten und virusinfizierten Reihe gegenüber der nur mit FPA behandelten Zellreihe zu verzeichnen. Hieraus folgt, daß bereits FPA eine Zunahme des

Metaphaseindex verursacht. Bei der infizierten und mit dem Inhibitor behandelten Zellreihe scheinen sich die virusbedingte und die durch FPA bewirkte Metaphasenzunahme zu addieren.

Im weiteren wurde deshalb ausschließlich der Einfluß von FPA auf die Zellteilung untersucht.

Es wurde festgestellt, daß es unter Einfluß von FPA zu einer geringen Mitosestimulierung kommt. Gleichzeitig bewirkt FPA auch eine Metaphasearretierung. Außerdem ergab sich aus unseren Versuchen, daß FPA nur in den ersten Stunden nach Behandlungsbeginn eine Zunahme der Zellteilung bewirkt. Unabhängig von der Einwirkungszeit verursacht FPA eine teilweise Arretierung der Metaphasen.

Hieraus ergab sich die Frage, ob der für FPA auf den Mitoseablauf beschriebene Effekt konzentrationsabhängig ist. Wie aus der Abb. 12 zu ersehen, nimmt zunächst der Metaphaseindex mit steigenden FPA-Konzentrationen kontinuierlich zu. Bei einer Konzentration von 25 μg FPA/ml beträgt er annähernd das Doppelte des Ausgangswertes. Bei einer noch höheren Konzentration nimmt die Zahl der Metaphasen gering ab und bleibt bis zu einer Konzentration von 200 μg FPA/ml in gleicher Höhe. Bei einer Dosis von 500 μg FPA/ml liegt gegenüber 200 μg FPA/ml der Metaphaseindex deutlich niedriger. Die Kurve der Metaphasenzahl der mit FPA und Colcemide behandelten Zellen zeigt ebenso zunächst einen kontinuierlichen Anstieg und erreicht bei 25 μg FPA/ml einen analogen Gipfel. Bei den folgenden höheren Konzentrationen nimmt der Metaphaseindex jedoch langsam ab. Hieraus geht hervor, daß durch niedrige FPA-Konzentrationen neben einem Colchizin-ähnlichen Effekt eine echte Mitosesteigerung bewirkt wird. Höhere Konzentrationen verursachen überwiegend eine Metaphasearretierung. Bei extrem hohen FPA-Konzentrationen kommt es zu einer Hemmung der Mitose.

Der Wirkungsmechanismus von FPA ist ausführlich untersucht worden. Er beruht darauf, daß die Substanz anstelle von Phenylalanin in das Protein eingebaut wird. Weiterhin wurde gefunden, daß FPA anstelle von Methionin bei E.coli eingebaut wird (MUNIER et al. (1959)). Die genannten Autoren haben die Wirkung von Strukturanalogen auf die Synthese von Strukturproteinen und Enzymen bei E. coli untersucht und konnten gleiche Einbauraten feststellen. Der Einbau von FPA in die alkalische Phosphatase wurde bei E. coli gefunden (RICHMOND (1963)).

BIESELE et al. (1954) zeigten einen mitosehemmenden und metaphasenarretierenden Einfluß von FPA auf bestimmte Tumorzellen. Auch bei menschlichen Amnionzellen bewirkt FPA eine Verlängerung der Mitosedauer (SISKEN et al. (1967)). Diese ergab sich durch eine Verlängerung des Metaphasestadiums. Sowohl nach verschiedenen langer Einwirkungsdauer als auch mit verschiedenen Konzentrationen konnte eine Verlängerung der Dauer der Metaphase gefunden werden. Obwohl bei diesen Versuchen andere Zellen, andere FPA-Konzentrationen und andere Einwirkungszeiten verwendet wurden, konnten wir den von SISKEN beobachteten Effekt der Metaphase-Verlängerung bestätigen. Der von uns unter FPA-Einwirkung beobachtete Effekt der Mitosesteigerung wurde bisher nicht beobachtet. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß in den bisherigen Untersuchungen anderer Autoren die FPA-Dosis nicht in ausreichendem Maße variiert wurde.

Nachdem die unterschiedliche Wirkung verschiedener FPA-Konzentrationen auf den Mitoseablauf beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob unter bestimmten Puromycin-Konzentrationen ein ähnlicher Effekt zu erzielen war.

Der Wirkungsmechanismus von Puromycin beruht darauf, daß am Ribosom der peptidyl-tRNS-Komplex gelöst wird und sich

ein peptidyl-Puromycin-Komplex und freie tRNS bilden (PADILLA et al. (S. 220-223)(1969)). Aus der Vielzahl der Arbeiten über die Hemmung der Proteinsynthese mit Puromycin in nicht infizierten Säugetierzellen seien nur angeführt: YARMOLINSKI et al. (1959); RABINOWITZ et al. (1962) und WETTSTEIN et al. (1964). Gleiche Befunde konnten bei Experimenten mit Bakterien (WISSEMAN et al. (1953); GALE et al (1953); CREASER (1955); TAKEDA et al. (1960) und in virusinfizierten Systemen (WHEELOCK (1962); WECKER (1963)) beobachtet werden.

Wir fanden auch unter steigenden Puromycin-Konzentrationen zunächst einen Anstieg der Metaphasezahl. Das Ausmaß war - wie unter der Einwirkung von FPA - etwa gleich groß. Bei einer Puromycin-Konzentration von $0,6 \mu\text{g/ml}$ war der Metaphaseindex gegenüber dem Ausgangswert um das Doppelte höher. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine Mitosesteigerung - im Gegensatz zur Wirkung von FPA - sondern nur um eine Verlängerung der Metaphasedauer, um einen Colchizin-ähnlichen Effekt. Arretiert man durch Colcemide alle in die Metaphase eingetretenen Mitosen, so steigt der Metaphaseindex dieser Reihe nicht an, sondern fällt kontinuierlich vom Ausgangswert (0-Konzentration von Puromycin) ab. Bei dem unter Puromycin-Einwirkung beobachteten Anstieg der Metaphasezahl handelt es sich also um einen partiellen Colchizin-ähnlichen Effekt. Gleichzeitig tritt eine Mitosehemmung auf. Diese tritt bei höheren Konzentrationen in den Vordergrund (Abb. 14 u. 15).

Bei unseren Ergebnissen der Puromycinwirkung auf den Mitoseablauf muß eine Einschränkung gemacht werden. Es ist nicht möglich (Abb. 16), daß der Metaphaseindex der nur mit Puromycin behandelten Zellen höher ist, als der Meta-

phase-Index der Zellen, die mit Puromycin und Colcemide behandelt wurden. Das ist nur so zu erklären, daß unter der gleichzeitigen Einwirkung von Colcemide und Puromycin die Zellen schlecht auf der Wand des Kulturgefäßes haften und bei der histologischen Behandlung der Präparate in größerem Ausmaß abgespült werden. Somit konnte nicht die wahre Zahl der in die Metaphase eingetretenen Zellen ermittelt werden.

Es kann somit festgestellt werden, daß Puromycin in niedrigen Konzentrationen einen teilweisen Colchizin-ähnlichen Effekt auf den Ablauf der Mitose ausübt. Weiterhin besteht eine mitosehemmende Wirkung. FPA verursacht hingegen neben einem teilweisen Colchizin-ähnlichen Effekt in niedrigen Konzentrationen in den ersten Stunden der Einwirkung eine echte Mitosesteigerung. Bei höheren Konzentrationen und bei längerer Einwirkung niedriger Konzentrationen überwiegt der metaphasenarretierende Effekt. Bei hohen FPA-Konzentrationen kommt es zu einer Hemmung der Mitose.

Bezüglich der Puromycinwirkung auf die Mitose stellten KISHIMOTO et al.(1964) bei ihren Untersuchungen fest, daß Puromycin den Eintritt in die Mitose verhindert. Die Blockierung der Mitosen in der Initialphase bei Hamster-Ovarialzellen wurde von TOBEY et al.(1966) beobachtet. SISKEN et al. (1967) fanden bei ihren Untersuchungen an menschlichen Amnionzellen keine, wie unter FPA-Einfluß beobachtete, Verlängerungen des Metaphasestadiums. In Übereinstimmung mit den genannten Autoren konnten wir die mitosehemmende Wirkung des Puromycins bestätigen. Die von uns beobachtete metaphasenarretierende Wirkung von Puromycin wurde bisher noch nicht beobachtet. Das liegt wahrscheinlich daran, daß bei den Untersuchungen die Dosis nicht in ausreichendem Maße variiert wurde.

Da sich gezeigt hat, daß die Proteinsynthese von wesentlicher Bedeutung für die Zellteilung ist, stellt sich die Frage, ob die sogenannten "Teilungsproteine" für die beschriebenen Vorgänge von Bedeutung sind. ZEUTHEN hatte 1964 erstmalig den Begriff des "Teilungsproteins" eingeführt (PADILLA et al. (S. 220-223) (1969)).

RASMUSSEN et al. (1962) haben die Zusammenhänge von Zellteilung und Proteinsynthese in Tetrahymen untersucht. Aufgrund ihrer Untersuchungen definieren die Autoren einen "Transitionspunkt". Der "Transitionspunkt" wird als der Punkt definiert, von dem ab durch Zugabe eines Inhibitors die nächste Zellteilung nicht verhindert oder deren Beginn nicht verzögert werden kann. Die zweite Zellteilung wird so beeinflusst, daß ihr Beginn verzögert wird. Weiterhin wurde eine "chemosynthetisch-" und eine "mechano-Phase" unterschieden. Beide Phasen sind durch den "Transitionspunkt" getrennt. Es wird die Hypothese aufgestellt, daß in der "chemo-synthetisch-Phase" ein Protein gebildet wird, das für die Zellteilung erforderlich ist.

Aus den Untersuchungsergebnissen der Zusammenhänge zwischen Energieverbrauch und Zellteilung wird gefolgert, daß zur Bildung der "Teilungsproteine" Energie notwendig ist (HAMBURGER (1962)).

Von anderen Untersuchern wird die Hypothese aufgestellt, daß für die Bildung der "Teilungsproteine" bestimmte Gene verantwortlich sind (KISHIMOTO et al. (1964)).

WATANABE et al. (1965) haben den Einbau von markiertem Phenylalanin bei synchronisierten Zellen gemessen. Dabei isolierten sie eine Fraktion, die möglicherweise dem "Teilungsprotein" entspricht. Andere Untersucher haben

sich ebenfalls bemüht, das "Teilungsprotein" zu isolieren (IKEDA et al. (1965); WATANABE et al. (1965 a)). Bei weiteren Versuchen wurde festgestellt, daß das "Teilungsprotein" SH-Gruppen enthält (WATANABE et al. (1965 b)).

Andere Autoren konnten kein "Teilungsprotein" nachweisen (SPIRIN et al. (S. 133) (1970)). Bei Untersuchungen mit menschlichen Amnionzellen wurde festgestellt, daß das "Teilungsprotein" in der G₂-Phase synthetisiert wird. Dieses Protein wird konserviert und von den Tochterzellen für die folgende Teilung wieder benutzt (SISKEN et al. (1967)).

Die Bedeutung der "Teilungsproteine" ist für die von FPA und Puromycin bewirkten Veränderungen im Mitoseablauf unklar. Am ehesten ließe sich damit der mitosehemmende und der metaphasenarretierende Effekt erklären. Wie jedoch der mitosesteigernde Effekt von FPA zu erklären wäre, ist völlig unklar.

Es ist fraglich, ob die unter FPA und Puromycin beobachteten Mitoseeffekte auf dem gleichen Mechanismus beruhen, wie bei bestimmten Virusinfektionen, nämlich der Hemmung der Proteinsynthese. Theoretisch könnten die Abschaltvorgänge im Verlauf einer Virusinfektion hierfür in Betracht kommen. Für das Poliovirus liegen hierfür nähere Untersuchungen vor (DIEFENTHAL et al. (1965); DIEFENTHAL et al. (1967); DIEFENTHAL et al. (1971 a); HABERMEHL et al. (1971)). Beim VSV wird diese Zuordnung bereits schwieriger; wie DIEFENTHAL et al (1971 b) zeigen konnten, kommt es beim VSV lediglich zur Abschaltung der zellulären RNS-Synthese, jedoch nicht der Proteinsynthese.

Versucht man eine hypothetische Zusammenfassung der mit FPA gewonnenen Ergebnisse, so könnte folgen, daß eine geringe Hemmung der Proteinsynthese zu einer Mitosesteigerung führt. Eine stärkere Hemmung der Proteinsynthese würde den

Colchizin-ähnlichen Effekt erklären. Eine weitgehende Hemmung der Proteinsynthese würde dann eine Hemmung der Mitose bewirken (HÄBERMEHL et al. (1970)).

Werden diese Überlegungen auf das Verhalten Polio-infizierter Zellen übertragen, so könnte man sagen, daß eine leichte Hemmung der Proteinsynthese im Beginn der Infektion eine Mitosestimulierung verursacht. Eine im weiteren Verlauf der Infektion stattfindende stärkere Hemmung der Proteinsynthese würde den Colchizin-ähnlichen Effekt erklären. Eine vollständige Hemmung der Proteinsynthese am Ende des Infektionsablaufes bewirkt die Mitosehemmung.

Sowohl für die Veränderungen nach Infektion mit Poliovirus als auch mit VSV ist durchaus offen, ob eine solche Zuordnung zulässig ist.

V. Zusammenfassung

- 1) In HEp-2 Zellkulturen, die mit Vesicular Stomatitis Virus infiziert wurden, kommt es in den ersten Stunden nach Infektionsbeginn zu einer geringen Steigerung der Zellteilung. Gleichzeitig tritt ein teilweiser Colchizin-ähnlicher Effekt auf.
Die Mehrzahl der aus der ~~Meta~~phase in die Telophase übergetretenen Zellen werden blockiert und sammeln sich in diesem Stadium der Zellteilung an. Diese Zellen sind erheblich morphologisch verändert.
- 2) DL-p-Fluorophenylalanin bewirkt in HEp-2 Zellkulturen während der ersten Stunden der Einwirkung eine Mitosesteigerung. Gleichzeitig bewirkt Fluorophenylalanin eine teilweise Metaphasenarretierung. Nach länger dauernder Einwirkung kommt es nur zu einer teilweisen Metaphasenarretierung, eine Mitosesteigerung erfolgt dann nicht mehr.
- 3) Die für Fluorophenylalanin beschriebenen Wirkungen sind von der Dosis abhängig. Niedrige Fluorophenylalanin-Konzentrationen bewirken eine Mitosesteigerung und eine Metaphasenarretierung, höhere Konzentrationen bewirken nur eine Metaphasenarretierung, extrem hohe Fluorophenylalanin-Konzentrationen bewirken eine Hemmung der Zellteilung.
- 4) Unter der Einwirkung niedriger Puromycin-Konzentration wird eine Zunahme der Metaphaserate beobachtet. Eine Abklärung dieses Befundes war aus methodischen Gründen nicht durchführbar. Höhere Puromycin-Konzentrationen bewirken eine Mitosehemmung.
- 5) Als Ursache dieser Zellreaktionen werden die Einwirkung der durch die Virusinfektion bewirkten "Abschalt-Vorgänge" und das "Teilungsprotein" diskutiert.

- ACKERMANN, W.W., RABSON, Ph.D.A. and KURTZ, H.: Growth characteristics of Poliomyelitis virus in HeLa cell cultures: lack of parallelism in cellular injury and virus increase.
J. exptl. Med. 100, 437 - 450 (1964)
- BARTSCH, H.D., HABERMEHL, K.-H. and DIEFENTHAL, W.: Chromosomal damage after infection with Poliomyelitis virus.
Exptl. Cell Res. 48, 671-675 (1967)
- BARTSCH, H.D., HABERMEHL, K.-O. and DIEFENTHAL, W.: Correlation between Poliomyelitis virus-Reproduction-Cycle, Chromosomal Alterations and Lysosomal Enzymes.
Arch. ges. Virusforsch. 27, 115-127 (1969)
- BIESELE, J.J. and JACQUEZ, J.A.: Mitotic effects of certain amino acid analogs in tissue culture.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 58, 1276-1287 (1954)
- BOYER, G.S., LEUCHTENBERGER, C. and GINSBERG, H.S.: Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with Adenoviruses.
J. exptl. Med. 105, 195-216 (1957)
- CREASER, E.H.: The induced (adaptive) biosynthesis of β -galactosidase in Staphylococcus aureus.
J. gen. Microbiol. 12, 288-297 (1955)
- DIEFENTHAL, W. and HABERMEHL, K.-O.: Vorrichtung zur Einstellung eines bestimmten Kohlensäure-Luftgemisches für Monolayer-Gewebekulturen in Petrischalen.
Zbl. Bakt. I Orig. 185, 11-13 (1962)
- DIEFENTHAL, W. and HABERMEHL, K.-O.: Untersuchungen über eine frühe Phase der Virusreproduktion. Nachweis einer Resistenz gegenüber dem Einfluß verschiedener Inhibitoren.
Zbl. Bakt. I Orig. 198, 331-371 (1965)
- DIEFENTHAL, W., HABERMEHL, K.-O. and HARTMANN, U.: Untersuchungen über den Ablauf der Proteinsynthese während der Frühphase der Virusreproduktion.
Zbl. Bakt. I Orig. 204, 55-79 (1967)
- DIEFENTHAL, W., HABERMEHL, K.-O. and SCHELP, F.P.: Die Wirkung von Metaboliteninhibitoren auf eine virusinduzierte Hemmung der makromolekularen Synthese der Wirtszelle.
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A 218, 32-40 (1971 a)

- DIEFENTHAL, W. and HABERMEHL, K.-O.: Studies of the "Cut-Off" of host cell synthesis induced by Poliomyelitis-virus.
Proc. of the First European Biophysics Congr. Vol. I 515 (1971 b).
- DULBECCO, R. and VOGT, M.: Plaqueformation and isolation of pure lines with Poliomyelitisvirus.
J. exptl. Med. 99, 167-182 (1954)
- EAGLE, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.
Science 122, 501-504 (1955)
- FASTIER, L.E.: Mitotic activity of virus infected cells.
Virology 10, 542-547 (1960)
- GALE, E.F. and FOLKES, J.P.: The assimilation of amino acids by bacteria.
15. Aktionen of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in Staphylococcus aureus.
Biochem. J. 53, 493-498 (1953)
- GODMAN, G.C., MORGAN, C., BREITENFELD, P.H. and ROSE, H.M.: A correlative study by electron and light microscopy of the development of type 5 Adenovirus.
II. Light microscopy.
J. exptl. Med. 112, 383-402 (1960)
- HABERMEHL, K.-O. und DIEFENTHAL, W.: Der Einfluß von Virusinfektionen auf den Ablauf der Zellteilung.
Zbl. Bakt. I Orig. 199, 273-314 (1966 a).
- HABERMEHL, K.-O.: The influence of virus infections on cell division.
V.M. Stakhanova, Abstracts of the IX. International Congress for Microbiology, p. 490, Moscow 1966(b).
- HABERMEHL, K.-O., DIEFENTHAL, R. und DIEFENTHAL, W.: Nachweis eines Colchizin-ähnlichen Effektes in Poliomyelitis-infizierten Gewebekulturen nach Unterbrechung der Virusreproduktion durch Guanidin.
Arch. Virusforsch. 26, 138-148 (1969).
- HABERMEHL, K.-O. and DIEFENTHAL, W.: Correlations between lysosomal enzymes, mitosis and chromosomal aberrations in Polio-infected cells.
Jf-18, X. International Congress for Microbiology. Mexico, D.F. 9-15 VII. 1970.
- HABERMEHL, K.-O. and DIEFENTHAL, W.: Problems Concerning the uncoating of the Viral genome during the reproduction cycle of Poliomyelitis virus.
Proteins Nucleotides, Proc. of the First European Biophysics Congr. Vol I, 513 (1971)

- HAMBURGER, K.: Division delays induced by metabolic inhibitors in synchronized cells of *Tetrahymena pyriformes*.
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Vol. 32, 359-370 (1962)
- IKEDA, M. and WATANABE, Y.: Studies on protein-bound sulphhydryl groups in synchronous cell division of *Tetrahymena pyriformis*.
Exptl. Cell Res. 32, 584-590 (1965)
- KISHIMOTO, S. and LIEBERMANN, L.: Synthesis of RNA and protein required for the mitosis of Mammalian Cells.
Exptl. Cell Res. 36, 92-101 (1964)
- LEPINE, P., CHANY, C., DROZ, B. and ROBBE-FOSSAT, F.: Cytopathogenic effect of two newly recognized Myxovirus strains: Mechanism of syncytial formation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 62-72 (1959)
- LEVINTOW, L. and DARNELL, E.J., Jr.: Effects of p-Fluorophenylalanine on Poliovirus replication.
Fed. Proc. 20, 1 (1961)
- MUNIER, R. and COHEN, G.N.: Incorporation of structural analogues of amino acid into the bacterial proteins during their synthesis in vivo.
Biophys. Acta. 31, 378-391 (1959)
- NORRYD, C. and FJEJDE, A.: The chromosomes in human tissue culture line HEP-2.
Cancer Res. 23, 197-200 (1963)
- PADILLA, G.M., WHITSON, G.L. and CAMERON, I.L.: The Cycle, Gene - Enzyme - Interactions.
Academic Press New York and London. 1969.
- RABINOWITZ, M. and FISHER, J.M.: A dissociative effect of Puromycin on the pathway of protein synthesis by Ehrlich ascites tumor cells.
J. biol. Chem. 237, 477-481 (1962)
- RASMUSSEN, L. and ZEUTHEN, E.: Cell-division and protein-synthesis in *Tetrahymena*, as studied with p-Fluorophenylalanine.
C.A. Carlsberg. 32, 333-358 (1962)
- RICHMOND, M.H.: Random Replacement of Phenylalanine by p-Fluorophenylalanine in Alkaline Phosphatase (S) Formed during Biosynthesis by *E. coli*.
J. Mol. Biol. 6, 284-294 (1963)

- SCHOLTISSEK, C. and ROTT, R.: Influence of p-Fluorophenylalanine on the production of viral ribonucleic acid and on the utilisability of viral protein during multiplication of fowl Plague virus
Nature 191, 1023-1024 (1961)
- SISKEN, J.E. and WILKES, E.: The time of synthesis and the conservation of mitosis-related proteins in cultured human amnion cells
J. Cell Biol. Vol. 34, 97-110 (1967)
- SPIRIN, A.S.; GAVRILOVA, L.P.: The Ribosome.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1970.
- STOKER, M.G.P. and NEWTON, A.: The effect of Herpes virus on HeLa cells dividing parasynchronously.
Virol. 7, 438-448 (1959 a).
- STOKER, M.G.P. and NEWTON, A.: Mitotic inhibition in HeLa cells caused by Herpes virus.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 129-132 (1959 b).
- TAKEDA, Y., HAYASHI, S., NAKAGAWA, H. and SUZUKI, F.: The effect of Puromycin on ribonucleic acid and protein synthesis.
J. Biochem. (Tokyo) 48, 169-177 (1960).
- TOBEY, R.A., PETERSEN, F.D. and ANDERSON, E.C.: Mengovirus replication. IV. Inhibition of chinese hamster ovary cell division as a result of infection with Mengovirus.
Virol. 27, 17-22 (1965)
- WATANABE, Y., and IKEDA, M.: Evidence for the synthesis of the "Division-protein" in *Tetrahymena pyriformis*.
Exptl. Cell Res. 38, 432-434 (1965)
- WATANABE, Y., and IKEDA, M.: Further confirmation of "Division-protein" in *Tetrahymena pyriformis*.
Exptl. Cell Res. 39, 464-469 (1965 a)
- WATANABE, Y., and IKEDA, M.: Isolation and characterization of the "Division-protein" in *Tetrahymena pyriformis*.
Exptl. Cell Res. 39, 443-452 (1965 b).
- WECKER, E., and SCHONNE, E.: Inhibition of viral RNA synthesis by p-Fluorophenylalanine.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 278-282 (1961)

- WECKER, E.: Effect of Puromycin on the replication of western equine Encephalitis and Poliomyelitis viruses.
Nature 197, 1277-1279 (1963)
- WETTSTEIN, F.O., NOLL, H. and PENMAN, S.: Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 87, 525-528 (1964)
- WHEELLOCK, E.F. and TAMM, I.: Mitosis and division in HeLa cells infected with Influenza on Newcastle disease virus.
Virology 8, 532-536 (1959)
- WHEELLOCK, E.F.: The role of protein synthesis in the eclipse period of Newcastle disease virus multiplication in HeLa cells as studied with Puromycin.
Proc. Nat. Acad. Sci., US 48, 1358-1366 (1962)
- WILDY, P., SMITH, C., NEWTON, A., BENDY, P.: Quantitative cytological studies on HeLa cells infected with Herpes virus.
Virology 15, 486-500 (1961)
- WISSEMAN, C.L., HAHN, F.E., HOPPS, H. and SMADEL, J.E.: Chloramphenicol inhibition of protein synthesis.
Feder. Proc. 12, 466 (1953)
- YARMOLINSKI, E.F. and DE LA HABA, G.L.: Inhibition by Puromycin of amino acid incorporation into protein.
Proc. Nat. Acad. Sci., US 45, 1721-1729 (1959)
- ZIMMERMANN, T., and SCHÄFER, W.: Effect of p-Fluorophenylalanine on fowl plague virus multiplication.
Virology 11, 676-698 (1960)

Herrn Professor Dr. K.-O. Habermehl danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung, Herrn Professor Dr. W. Diefenthal für Anregungen, die er mir zur Durchführung der Arbeit gab.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau E. John, Fräulein H. Voss und Frau G. Maslonka für Hilfe und Rat bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 3. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Johannes John und seiner Ehefrau Irene geb. Häusler in Bitterfeld geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und der Oberschule bestand ich das Abitur 1959 in Bitterfeld und begann im selben Jahr das Studium an der Humboldt Universität in Ost-Berlin.

Im Wintersemester 1961 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität in West-Berlin, das ich von 1963 bis 1965 an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg fortsetzte und im Sommersemester 1969 an der Freien Universität Berlin beendete.

Am 14. August 1962 bestand ich das Vorphysikum, am 26. Februar 1965 das Physikum und am 20. November 1968 beendete ich das Medizinische Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

Am 1. April 1970 habe ich die Approbation als Arzt erhalten und bin seitdem als Assistenzarzt im Städtischen Wenckebach-Krankenhaus Tempelhof tätig.

